

*Max Douglas Faria*

Avaliação da Resposta Tecidual e  
Citotoxicidade dos Cimentos: *Ángelus MTA*<sup>®</sup>  
*Cinza e CPM*<sup>®</sup> Cimento Portland Modificado

ARAÇATUBA – SP  
2010

*Max Douglas Faria*

Avaliação da Resposta Tecidual e  
Citotoxicidade dos Cimentos: *Ángelus MTA*<sup>®</sup>  
*Cinza e CPM*<sup>®</sup> Cimento Portland Modificado

*Tese apresentada à Faculdade de Odontologia,  
Campus de Araçatuba, Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte  
integrante dos requisitos para obtenção do título  
de “Doutor em Odontopediatria.”*

*Orientador Prof. Dr. João Eduardo  
Gomes Filho*

ARAÇATUBA – SP  
2010

## *DADOS CURRICULARES*

*Max Douglas Faria*

<b>Nascimento</b>	18 de Abril de 1978 Santa Fé do Sul – SP
<b>Filiação</b>	Getúlio Faria Leonice Cardoso Faria
<b>1998.2001</b>	Curso de Graduação em Odontologia, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba Unip – Universidade Paulista.
<b>2002.2003</b>	Curso de Especialização em Odontopediatria, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, SP.
<b>2003.2004</b>	Professor da Disciplina de Odontopediatria e Estágio Extra Mural das Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul Funec.
<b>2005.2006</b>	Mestrado em Odontopediatria, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, SP.
<b>2007.2010</b>	Doutorado em Odontopediatria, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, SP.

*Dedicatoria*

*Dedicatoria*



*A DEUS...*

*“Perto quero estar, junto aos teus pés.*

*Pois prazer maior não há que me render e te adorar*

*Tudo o que há em mim quero te ofertar  
mais ainda é pouco eu sei, se comparado ao que ganhei*

*Não sou apenas servo, teu amigo me tornei*

*Te louvarei, não importam as circunstâncias*

*A dorarei somente a ti Jesus”*

*(Kelly Carpenter, Toque no altar)*

*Aos meus pais, Getúlio e Leonice...*

*Muito obrigada pelo apoio constante, pelo carinho*

*e por todo amor e dedicação.. Obrigada por tudo o que representam em minha vida !*

*"Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar."*  
*(Bertrand Russell)*

*Ao meu irmão Marcus e minha cunhada Queatrin,*

*"... mas há um amigo que é mais chegado do que um irmão"*

*(Provérbios 18:24)*

*Muito obrigada pela amizade e apoio em todos os momentos... que me permitem estar hoje comemorando mais essa vitória.*

*"A amizade é quase sempre a união de parte de uma alma com parte de outra.*

*"As pessoas são amigas nos pontos que se tocam"*

*(George Santayana)*

*As minhas sobrinhas Nara, Laura e Alice...*

*Por vocês tenho um amor inexplicável, incomparável...*

*Como sou feliz por te-las em minha vida...*

*A minha avó Maria, que sempre pediu a Deus por mim em suas orações...*

*A minha namorada Thaisa, o quem a amo muito e teve grande importância durante toda minha trajetória da Pós-graduação. Obrigada pela paciência, força e por todo amor demonstrado a mim!*

*"Amor de Família é a coisa mais inexplicável do mundo, nem um pai consegue dizer para um filho o quanto ama, nem o filho sabe dizer ao pai, então eles simplesmente demonstram..."*

*Pa sini*



*Agradecimentos Especiais*

*Agradecimentos Especiais*





# *Agradecimentos Especiais*

*Ao meu orientador, Professor Dr. João Eduardo Gomes Filho...*

*Muito obrigado por toda dedicação, paciência e seriedade com que conduziu este estudo*

*Agradeço imensamente pela confiança que depositou em mim e por todas as orientações valiosas neste período de convivência.*

*“Um bom professor educa seus alunos para uma profissão, um professor fascinante os educa para a vida.*

*Professores fascinantes são profissionais revolucionários.*

*Ninguém sabe avaliar o seu poder, nem eles mesmos.*

*Eles mudam paradigmas, transformam o destino de um povo e um sistema social sem armas,*

*tão somente por prepararem seus alunos para a vida*

*através do espetáculo das suas idéias.”*

*Augusto Cury*

*Ao Professor Dr. Robson Frederico Cunha*

*“Um bom professor é lembrado nos tempos de escola,*

*Um professor fascinante é um mestre inesquecível...*

*Ser um mestre inesquecível é formar seres humanos que farão diferença no mundo ”*

*Augusto Cury*

*Muito obrigado por tudo que fez por mim, sou grato por cada momento de aprendizagem e amizade, os quais levo em minha vida.*

*"A queles que passam por nós não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós." (Antoine de Saint-Exupéry)*

*A Professora Dra. Samira Âmbar Lins*

*Professora... Líder... Amiga... Sou grato por tudo*

*““ Educar é ser um artesão da personalidade, um poeta da inteligência, um semeador de idéias.”(Augusto Cury)*

*“A Tarefa do educador moderno não é derrubar florestas, mas irrigar desertos”*

*C.S.Lewis*



*Aos amigos e compadres Karina Bianco e Pedro Ivo...*

*Amizades verdadeiras... Amigos irmãos...  
Não vou esquecer jamais dos bons momentos... Conversas até altas horas da  
madrugada, regadas sempre a uma boa xícara de café e muitos risos e histórias!  
Sucessos meus amigos... A dor de vocês!*

*As amigas Tatyana e Janaína...*

*As melhores histórias jamais serão escritas, assim como os melhores momentos jamais  
retornarão. Por isso, quando estiveres feliz, tire o máximo proveito desta felicidade,  
pois o tempo arrastará tudo.. e só ficarão as lembranças!”*

*Vivi com vocês os melhores momentos de minha vida em Araçatuba... As festas, os  
almoços, as alegrias, tristezas, a formação do Trio Maravilha... Amo vocês..  
Obrigado por tudo!*

*A amiga Fabiana Tanaka...*

*Amigo é quem te dá um pedacinho do chão, quando é de terra firme que você precisa,  
ou um pedacinho do céu, se é o sonho que te faz falta.  
Obrigado por me ouvir, ajudar e sempre ter a palavra certa, no momento certo..  
Obrigado por tudo!*

*A amiga Simone Watanabe...*

*Agradeço por sua paciência, sua ajuda constante em meu trabalho de tese.. Saiba que  
neste pequeno trabalho tem muito de você.. Sucessos!*

*“A melhor parte da vida de uma pessoa está em suas amizades”*

*Abraham Lincoln*



*Agradecimientos*



*Agradecimientos*

# *Agradecimentos*

*À Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, nas pessoas do Diretor Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé e Vice-Diretora Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhia.*

*Aos professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, Prof. Dr. Célio Percinoto, Profª. Dra. Rosângela dos Santos Nery, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem e Profª. Dra. Sandra Maria Herondina Coelho Ávila de Aguiar, por todo este longo período de convivência, pelas orientações valiosas e ensinamentos transmitidos.*

*Aos professores da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, Prof. Dr. Roberto Holland, Prof. Dr. Valdir de Souza, Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé, Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho Prof. Dr. Mauro Nery, Prof. Dr. José Arlindo Otoboni Filho e Prof. Dr. Eloi Dezan Junior, por me receberem da maneira tão especial como fui recebido, pelo carinho e amizade durante o curso*

*Às funcionárias da Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, Hermelinda de Jesus Pereira Before, Neuza Angélica dos Santos e Neuci Vieira. Muito obrigado por todo apoio durante a realização deste trabalho e pela convivência agradável e amizade*

*Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba UNESP, Maria dos Santos Ferreira Fernandes e Mário Luis da Silva, pela ajuda constante, pela dedicação e por apoio neste nosso longo tempo de convívio*



*Aos “amigos de longa data” da pós-graduação da Odontopediatria, Karina Bianco, Tatyana Pereira, Pedro Ivo, Janaína Zavitoski e Karina Mirela. Pessoas especiais que tive o prazer de conhecer, por todos os momentos que passamos juntos.*

*Aos amigos de turma Alessandra Gomes, Taís Elizabeth, Eliana Takeshita e Janaína Zavitoski, pela amizade, pelo apoio e pelo excelente convívio durante este período. Grande sucesso a vocês!*

*Aos que se tornaram meus grandes “amigos de laboratório”, Alessandra Gomes, Simone, Sueli, Denise, Renata e Alessandra Cury pela amizade, pelo apoio e pelo excelente convívio durante este período. Grande sucesso a vocês!*

*A todos os meus colegas de Pós-graduação da Odontopediatria, muito obrigado pelos momentos de convivência.*

*Aos funcionários da Seção de Pós Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, Marina Midori Sakamoto Hawagoe, Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto e Diogo Reatto pelo excelente profissionalismo, atenção dispensada e primoroso relacionamento*

*Aos funcionários da Biblioteca: Ana Cláudia Grieger Manzatti, Cláudia de Souza Frare, Cláudio Hideo Matsumoto, Isabel Pereira de Matos, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Izamar da Silva Freitas, Jéssica Durbergr, Luzia Anderlini, Maria Cláudia de Castro Benez, Fernando Sukunishi e Cláudio Maciel Júnior, pela atenção e eficiência que sempre dispensaram*

*À Magda Requena Caciatore, secretária do departamento de Odontologia Restauradora, pelo carinho, paciência e atenção*



*Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Sr. Camilo, João e Odair pelo apoio e auxílio e pela dedicação no tratamento dos animais.*

*Ao Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada por ter me permitido utilizar o biotério, possibilitando a realização deste trabalho*

*Aos meus colegas de trabalho, professores da disciplina de Odontopediatria e Clínicas Odontopediátricas, do Curso de Odontologia das Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul FUNEC, Ana Keila Bordon, Renato Manzari e Murilo Sousa Guimarães, vocês são exemplos de profissionais na docência. Obrigado pela força!*

*À Coordenadora e amiga do Curso de Odontologia das Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul FUNEC, Professora Dra. Samira Âmbar Lins, obrigado por acreditar em meu trabalho, me dando oportunidades ao meu crescimento profissional. Admiro-te muito, Obrigado por tudo!*

*Aos Professores do Curso de Odontologia das Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul FUNEC, Prof.Dr.Ariovaldo Martins, Profa. Dra. Ivana Maria Esteves Maciel, Prof. Dr. Takeu Ademar Furuse, Prof. Dr. Arnaldo Santana e Profa. Dra. Claudia, por fazerem parte da minha vida acadêmica como meus professores e hoje como meus colegas de docência... Aprendi muito com todos vocês. Obrigada!*

*A todos meus colegas de trabalho da Disciplina de Estágio Extra Mural, do Curso de Odontologia das Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul, FUNEC Obrigada!*

*Aos funcionários das Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul, FUNEC pelo carinho e torcida!*



*Aos meus alunos do 5º Ano de Odontologia das Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul-FUNEC, mas principalmente a VIII Turma de Odontologia FUNEC, o qual tive o grande presente de ser escolhido por vocês como Nome de Turma. Não vou esquecer nunca tal homenagem, todos vocês são minhas grandes inspirações nas buscas de meus sonhos e minha realização como docente! Sucessos a vocês, Doutores!*

*À empresa Ângelus® e à empresa EGEO®, por terem cedido os materiais para serem utilizados nos experimentos.*

*A CAPES, pelo apoio financeiro que viabilizou a realização deste trabalho de pesquisa.*

*A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.*

**“Posso esquecer-me do rosto de alguém e do que ele me falou, mas não esquecerei o que este alguém me fez sentir”**

**Pasini**



# *Spigirapt*

*Spigirapt*





# Epígrafe

*“Escute aquela pequena voz que vem de dentro de você*

*Se você não vive a sua vida completamente, realizando as metas que julgou importantes, dando sua contribuição única para o mundo, ninguém mais irá fazê-lo. Sua canção morrerá com você.*

*Muitos de nós já descobriram o que fazer com suas vidas. Nós temos um propósito que ecoa do centro do nosso ser. De algum modo, nossas vidas nunca estarão completas a menos que respondamos a este chamado. Mas nos recusamos... ‘A queda vizinha’ sussurra um sonho... Mas, mais tarde, mais dia menos dia, nossa visão começará a desaparecer... Imersa na praticidade..*

*Nós nos arrastamos pelos mais altos caminhos do conformismo, seguindo os outros. Buscamos o que os outros buscam – conforto, segurança, dinheiro, poder, prazer. Não estamos sozinhos, mas somos estranhos para o melhor de nós mesmos. Os anos deixam rugas na pele, mas a perda de entusiasmos deixa rugas na alma. É impossível dizer a alguém que caminho seguir. Somente você, com tranquilidade e humildade, pode ouvir a pequena voz dentro de você. Sucesso e felicidade não são metas distantes de serem capturadas e mantidas.*

*“A contagem é acidentalmente enquanto você está se realizando.”*

*Michel Lynberg: The Gift of Giving*



# *Somário*

*Somário*



# Sumário

Lista de Figuras .....	19
Lista de Tabelas.....	22
Introdução Geral .....	24

## **Capítulo 1 - Avaliação da Resposta tecidual dos Cimentos: Ângelus MTA® Cinza e CPM® Cimento Portland Modificado. Análise Microscópica de Implantes em Subcutâneos de Ratos**

Resumo.....	31
Abstract.....	33
1.1 Introdução .....	35
1.2 Proposição .....	38
1.3 Material e Método .....	40
1.4 Resultados .....	50
1.5 Discussão.....	71
1.6 Conclusão .....	74
1.7 Referências .....	76

## **Capítulo 2 - Avaliação da citotoxicidade do Ângelus MTA® Cinza e CPM® Cimento Portland Modificado. Análise em cultura de fibroblastos.**

Resumo.....	83
Abstract.....	85
2.1 Introdução .....	87
2.2 Proposição .....	90
2.3 Material e Método .....	92
2.4 Resultados .....	96
2.5 Discussão.....	99
2.6 Conclusão .....	102
2.7 Referências .....	104

<b>Anexos .....</b>	<b>108</b>
---------------------	------------

*Sisters*

*Sisters*



# *Lista de Figuras*

## Capítulo 1

<b>Figura 1 – (A)</b> Grupo MTA, H. E, 10X, 7 dias. <b>(B)</b> Grupo MTA, V.K., 10X, 7 dias. <b>(C)</b> MTA Luz Polarizada, 10X, 7 dias.....	51
<b>Figura 2 – (A)</b> Grupo MTA, H. E, 10X, 15 dias. <b>(B)</b> Grupo MTA, V.K., 10X, 15 dias <b>(C)</b> Grupo MTA, Luz Polarizada, 10X, 15 dias.....	52
<b>Figura 3 –(A)</b> Grupo MTA, H. E, 10X, 30 dias. <b>(B)</b> Grupo MTA, V.K., 10X, 30 dias <b>(C)</b> Grupo MTA, Luz Polarizada, 10X, 30 dias.....	53
<b>Figura 4 –(A)</b> Grupo MTA, H. E., 10X, 60 dias <b>(B)</b> Grupo MTA, V.K., 10X, 60 dias <b>(C)</b> Grupo MTA, Luz Polarizada, 10X, 60 dias.....	54
<b>Figura 5 –(A)</b> Grupo MTA, H. E, 10X, 90 dias <b>(B)</b> Grupo MTA, V.K., 10X, 90 dias <b>(C)</b> Grupo MTA Luz Polarizada, 10X, 90 dias.....	55
<b>Figura 6 –(A)</b> Grupo CPM, H. E, 10X, 7 dias. <b>(B)</b> Grupo CPM, V.K., 10X, 7 dias <b>(C)</b> Grupo CPM Luz Polarizada, 10X, 7 dias.....	57
<b>Figura 7 –(A)</b> Grupo CPM, H. E, 10X, 15 dias <b>(B)</b> Grupo CPM, V.K., 10X, 15 dias <b>(C)</b> Grupo CPM Luz Polarizada, 10X, 15 dias.....	58
<b>Figura 8 –(A)</b> Grupo CPM, H. E, 10X, 30 dias. <b>(B)</b> Grupo CPM, V.K., 10X, 30 dias. <b>(C)</b> Grupo CPM Luz Polarizada, 10X, 30 dias.....	59
<b>Figura 9 –(A)</b> Grupo CPM, H. E, 10X, 60 dias <b>(B)</b> Grupo CPM, V.K., 10X, 60 dias <b>(C)</b> Grupo CPM Luz Polarizada, 10X, 60 dias.....	60
<b>Figura 10 –(A)</b> Grupo CPM, H. E, 10X, 90 dias. <b>(B)</b> Grupo CPM, V.K., 10X; 90 dias. <b>(C)</b> Grupo CPM Luz Polarizada, 10X, 90 dias.....	61
<b>Figura 11 –(A)</b> Grupo Controle, H. E, 10X, 7 dias.( <b>B)</b> Grupo Controle, V.K., 10X, 7 dias <b>(C)</b> Grupo Controle Luz Polarizada, 10X, 7 dias.....	63
<b>Figura 12 –(A)</b> Grupo Controle, H. E, 10X, 15 dias. <b>(B)</b> Grupo Controle, V.K., 10X, 15 dias <b>(C)</b> Grupo Controle Luz Polarizada, 10X, 15 dias.....	64

<b>Figura 13</b> –(A) Grupo Controle, H. E, 10X 30 dias (B) Grupo Controle, V.K., 10X, 30 dias (C) Grupo Controle Luz Polarizada, 10X, 30 dias.....	65
<b>Figura 14</b> –(A) Grupo Controle, H. E, 10X, 60 dias (B) Grupo Controle, V.K., 10X, 60 dias (C) Grupo Controle Luz Polarizada, 10X, 60 dias.....	66
<b>Figura 15</b> –(A) Grupo Controle, H. E, 10X, 90 dias (B) Grupo Controle, V.K., 10X, 90 dias (C) Grupo Controle Luz Polarizada, 10X, 90 dias.....	67

## Capítulo 2

<b>Figura 1</b> – Comparação dos níveis de I L-1 6.....	96
<b>Figura 2</b> – Comparação dos níveis de I L -1 B.....	97
<b>Figura 3</b> – Comparação da viabilidade celular.....	97



## *Lista de Tabelas*

<b>Tabela 1:</b> Divisão dos animais por 3 grupos.....	44
<b>Tabela 2:</b> Escores utilizados na análise quantitativa.....	48
<b>Tabela 3:</b> Comparação entre os grupos.....	68





# *Introdução Geral*

*Introdução Geral*



## *Introdução Geral*

Devido ao avanço técnico e científico ao longo dos anos, a odontologia vem buscando desenvolver recursos que aperfeiçoem cada vez mais o atendimento ao paciente. Neste sentido, a endodontia também vem sofrendo uma intensa evolução tanto no campo biológico quanto nos procedimentos técnicos, buscando aprimorar as propriedades dos materiais existentes ou o desenvolvimento de novos materiais com características mais adequadas.

Neste sentido, diversos estudos clínicos e laboratoriais vêm sendo realizados para potencializar o índice de sucesso obtido com o tratamento endodôntico, uma vez que está diretamente relacionado não só à execução correta dos procedimentos biomecânicos como também ao emprego de materiais que apresentem propriedades cada vez mais favoráveis.

Os materiais utilizados no tratamento endodôntico, por permanecerem em contato direto com estruturas vitais, precisam ser biocompatíveis para favorecer o processo de reparo apropriado. Desta forma, não devem promover necrose tecidual extensa nem influenciar negativamente as células envolvidas na reparação tecidual, de modo que não atuem como um corpo estranho, induzindo ou perpetuando a injúria tecidual.

Torna-se ainda necessário, que o material de escolha para o tratamento endodôntico, apresente algumas propriedades físico-químicas que o viabilizem para esse fim, promovendo um selamento marginal efetivo e se mantendo estável na presença de umidade. No início da década de 90, a equipe de pesquisadores da Universidade de Loma Linda, Califórnia – EUA idealizaram e desenvolveram um

material com o objetivo de selar todas as comunicações entre o sistema de canais radiculares e a superfície externa do dente. Este foi denominado de agregado trióxido mineral ou MTA.

O MTA é um material biocompatível, indutor de dentinogênese, cementogênese e osteogênese, radiopaco, possuem ação antimicrobiana, promove selamento adequado prevenindo microinfiltração bacteriana e infiltração de endotoxinas. De forma geral, tem-se observado que o MTA apresenta propriedades físico-químicas e biológicas favoráveis, sendo amplamente empregado no tratamento endodôntico. Por outro lado, apesar de suas inúmeras características positivas, este material apresenta algumas dificuldades durante sua manipulação, um tempo de presa demorado e um tempo de trabalho relativamente curto, fatores estes que poderiam, por sua vez, desestimular seu uso em algumas situações clínicas.

Encontra-se atualmente disponível no mercado odontológico sob os nomes comerciais de MTA ProRoot<sup>®</sup> (Dentsply) e Ângelus MTA<sup>®</sup> (Ângelus), ambos com características físico-químicas e biológicas semelhantes. Em 2003 foi lançado na Argentina o CPM<sup>®</sup> (Cimento Portland Modificado), que se apresenta com composição semelhante ao ProRoot<sup>®</sup> (Dentsply) e MTA-Angelus<sup>®</sup> (Ângelus) e mesmas propriedades físico-químicas e biológicas. Contudo, segundo o fabricante, foi acrescentado carbonato de cálcio para que seu pH após o endurecimento caia de 12,5 para 10,0, limitando assim, a necrose superficial do tecido adjacente e permitindo a ação da fosfatase alcalina. Na literatura, não se observam trabalhos que comprovem biocompatibilidade do CPM<sup>®</sup> em nenhum modelo experimental. Para tanto, antes da indicação clínica, é necessário testar a biocompatibilidade deste

novo material e nestes casos a utilização de modelos experimentais “*in vivo*”, como o subcutâneo de ratos e “*in vitro*”, como cultura de células.

Desta forma o estudo foi dividido em 2 capítulos. No primeiro capítulo, **Avaliação da resposta tecidual dos Cimentos: Ângelus MTA® Cinza e CPM® (Cimento Portland Modificado). Análise Microscópica de Implantes em Subcutâneos de Ratos.**

No segundo capítulo “**Avaliação da citotoxicidade do Ângelus MTA® Cinza e CPM® (Cimento Portland Modificado). Análise em cultura de fibroblastos**”.

**\*As referências citadas na Introdução Geral estão expostas no anexo 4.**

# Capitulo I



# *Capítulo 1*

---

*Avaliação da Resposta Tecidual dos  
Cimentos: Ângelus MTA® Cinza e CPM®  
Cimento Portland Modificado. Análise  
Microscópica de Implantes em Subcutâneos  
de Ratos.*







*Resumo*

*Resumo*



## *Resumo*

**FARIA, MD. Avaliação da Resposta Tecidual dos Cimentos: Ângelus MTA® Cinza e CPM® Cimento Portland Modificado. Análise Microscópica de Implantes em Subcutâneos de Ratos.** Araçatuba, 2010. 117 f. Tese (Doutorado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual do tecido subcutâneo de rato ao implante de tubos de polietileno preenchidos com CPM® (Cimento Portland Modificado) comparado com Ângelus MTA®. Estes materiais foram colocados em tubos de polietileno e implantados no tecido conjuntivo dorsal de ratos Wistar por 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Os espécimes foram preparados para serem corados com HE, Von Kossa ou não corados para luz polarizada. Foi realizada análise qualitativa e quantitativa da reação inflamatória. Os materiais CPM® e Ângelus MTA® causaram reação moderada no tempo experimental de 7 dias que diminuiu com o tempo. A resposta foi similar entre os grupos Controle, CPM® e Ângelus MTA® no tempo experimental de 30 dias. Aos 60 e 90 dias todos os grupos foram semelhantes ao Controle. Mineralizações e granulações birrefringentes à luz polarizada foram observadas com ambos os materiais. Pode-se concluir que o CPM® apresentou resposta tecidual semelhante ao Ângelus MTA® inclusive com estimulação de formação de tecido mineralizado.

Palavras-chave: MTA. Biocompatibilidade. Tecido conjuntivo.

*Abstract*

*Abstract*



## *Abstract*

**FARIA, MD. Evaluation of the Biocompatibility of Cement: Gray Angelus MTA and CPM®. Microscopic analysis of subcutaneous implants in rats.** Araçatuba, 2010. 117 f. Thesis (Doctorate in Dentistry) - Faculty of Dentistry, Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho ".

The aim of this study was to evaluate the tissue response of rat subcutaneous tissue implantation of polyethylene tubes filled com CPM® (Portland Cement Modified) compared with Angelus MTA®. These materials were placed in polyethylene tubes and implanted into dorsal connective tissue of rats by 7,15,30,60 and 90 days. The specimens were prepared to be stained with HE, Von Kossa staining or without staining for polarized light. It were performed qualitative and quantitative analysis of reactions inflammatory. CPM materials® and Angelus MTA® caused a moderate reaction in the experimental period of 7 days decreased with time. The response was similar between control, CPM® and Angelus MTA® in the experimental time of 30 days. At 60 and 90 days all groups were similar to control. Mineralization and granulations birefringent to polarized light were observed with all materials. It was possible that CPM® presented similar tissue response to Angelus MTA® including with mineralized tissue stimulation.

Keywords: MTA. Biocompatibility. Connective tissue.



*Introdução*

*Introdução*



## 1.1 Introdução

O material reparador endodôntico ideal, deve aderir à estrutura dental, manter um bom selamento, ser insolúvel, não reabsorvíveis, radiopaco e apresentar boa biocompatibilidade. Uma série de materiais tem sido utilizada para a obturação e reparação de perfurações radiculares, mas nenhum foi capaz de satisfazer as necessidades totais de um material ideal. (1)

O Agregado de trióxido mineral MTA, é um biomaterial que tem sido amplamente investigado para aplicações endodônticas desde 1990, mas foi descrito pela primeira vez na literatura científica odontológica em 1993 (2) e recebeu a aprovação pela Food and Drug Administration U.S, em 1998 (3). Estudos têm demonstrado que o MTA promove reações teciduais favoráveis, caracterizada pela ausência de severa resposta inflamatória, presença de uma cápsula fibrosa e indução de reparo do tecido mineralizado (4,6). O MTA tem sido utilizado tanto para aplicações cirúrgicas e não cirúrgicas, para o preenchimento da extremidade radicular, reparações de perfurações, capeamento pulpar direto e apicificações (4,8). Comparado a outros materiais obturadores, o MTA tem boa capacidade de selamento, biocompatibilidade e atividade antimicrobiana (9,12).

O pó do MTA é misturado com água estéril e recomenda-se que uma bolinha de algodão úmida deva ser temporariamente colocada em contato direto com o material. Após a hidratação, o MTA forma um gel coloidal que se solidifica a uma estrutura dura em cerca de 3 a 4 horas (1,13,14) com a umidade dos tecidos circunvizinhos, supostamente ajudando a reação de fixação (5). O MTA tem um PH inicial de 10,2, que sobe para 12,5 três horas após a sua manipulação (1,14,15). O



processo de presa do MTA é descrito como uma reação de hidratação do silicato tri cálcio ( $3\text{CaO},\text{SiO}_2$ ) e silicato de bi cálcio ( $2\text{CaO},\text{SiO}_2$ ), que este último é considerado responsável pelo desenvolvimento da dureza do material (1,13). Embora mais frágil que os outros materiais utilizados para fins semelhantes, a força compressiva do MTA tem sido relacionada com o aumento na presença de umidade de até 21 dias (1,14). Em 2001, a empresa Ângelus Soluções odontológicas introduziu um MTA desenvolvido no Brasil, que é aparentemente idêntico ao desenvolvido por Torabinejad e sua equipe (1,16,17).

Em 2004, o CPM<sup>®</sup> (Cimento de Portland Modificado Egeo SRL, Buenos Aires, Argentina) foi desenvolvido, e se apresenta como uma versão modificada do cimento Portland. O pó também consiste em finas partículas hidrofílicas que forma um gel coloidal na presença de umidade, solidificando para formar um cimento duro em uma hora (16,18). A presença do carbonato de cálcio é a diferença mais significativa, que pretende aumentar a liberação de íons cálcio, e manter a solubilidade, adesão, fluidez e biocompatibilidade (19,20). O fabricante diz que sua composição química é semelhante ao MTA, mas com a adição de carbonato de cálcio para reduzir o Ph 12,5-10, 0, após a sua presa. Dessa forma, a necrose da superfície em contato com o material é restrita. Embora o CPM<sup>®</sup> aparentemente apresente características positivas na sua utilização.

Assim o objetivo deste estudo foi a avaliação comparativa da reação do tecido conjuntivo subcutâneo de ratos ao CPM<sup>®</sup> (Cimento de Portland Modificado) (Egeo SRL, Buenos Aires, Argentina) em comparação com Ângelus MTA<sup>®</sup> cinza (Ângelus Londrina Brasil).

*Proposição*



*Proposição*

## *1.2 Proposição*

A proposição deste estudo foi avaliar quantitativamente e qualitativamente a resposta tecidual frente ao implantes de tubos de polietileno preenchidos pelos cimentos CPM<sup>®</sup> (Cimento Portland Modificado) e Ângelus MTA<sup>®</sup> cinza em tecido subcutâneo de ratos.

# *Material e Método*

*Material e Método*



## *1.3 Material e Método*

### **1.3.1 Animais**

Para a realização deste trabalho, foram utilizados 30 ratos machos (*Rattus*, noruegueses, Albinus, Wistar), com idades aproximadas de 90 dias, pesando aproximadamente 280g, sendo provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba UNESP.

Os animais foram mantidos em ambientes com temperatura entre 22° e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas, contendo cinco ratos por gaiola.

No interior das gaiolas havia cama de serragem, a qual foi trocada diariamente. Esses animais foram alimentados antes e durante todo o período experimental, com ração sólida triturada e água “ad libitum”, exceto nas primeiras 12 horas pré e pós-operatórias.

Previamente ao início do experimento, o projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do comitê de ética no ensino e pesquisa em animal (CEEPA – Processo nº2007-002901) aprovado em 31 de julho de 2008 (ANEXO 1).

### 1.3.2 Materiais retrobturadores

Foram empregados os cimentos Ângelus MTA<sup>®</sup> Cinza (Ângelus Soluções Odontológico-Londrina Paraná) e CPM<sup>®</sup> (Cimento Portland Modificado - EGEO S.R.L., Buenos Aires, Argentina)

### 1.3.3 CPM (Cimento Portland Modificado)

O cimento CPM apresenta embalagem composta por um frasco contendo 2 gramas de pó e 1 frasco contendo 5 mililitros de solução fisiológica estéril. A sua fórmula apresenta a seguinte composição:

- **Pó:** dióxido de sílica, óxido de potássio, alumina, trióxido de enxofre, óxido de cálcio, óxido de bismuto, óxido de magnésio, carbonato de cálcio, bióxido de silício, trióxido de bismuto, sulfato de bário e resíduos insolúveis (sílica cristalina, óxido de cálcio e sulfato de potássio e sódio).
- **Líquido:** solução fisiológica estéril.

### 1.3.4 Cimento Reparador Ângelus MTA<sup>®</sup> Cinza

O cimento Ângelus MTA<sup>®</sup> apresenta embalagem composta por um frasco contendo 1 grama de pó e 1 frasco contendo 3 ml de água destilada, além de uma espátula para manipulação.

A sua fórmula apresenta a seguinte composição:

- **Pó:** dióxido de silício, óxido de potássio, alumina, trióxido de enxofre, óxido de sódio, trióxido de ferro, óxido de cálcio, trióxido de bismuto, óxido de

magnésio, e resíduos insolúveis (sílica cristalina, óxido de cálcio e sulfato de potássio e sódio).

- **Líquido:** solução fisiológica estéril.

### 1.3.5 Tubos de polietileno

Noventa tubos de polietileno (Abbott Lab of Brazil, São Paulo, SP, Brazil) estéreis com 1,0mm de diâmetro interno e 1,6mm de diâmetro externo e 10,0mm de comprimento foram utilizados em nossa pesquisa, sessenta tubos foram preenchidos com os materiais testados. O Ângelus MTA<sup>®</sup> Cinza e o CPM foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes e introduzidos nos tubos com uma espiral lentulo (Maillefer Dentsply, Tulsa, OK). Trinta tubos de polietileno permaneceram vazios e foram usados como controle.

### 1.3.6 Anestésico

Foram empregados como sedativos Dopaser (Laboratórios Calier AS, Barcelona-Espanha) a base de xilazina (relaxante muscular, analgésico e sedativo) na dosagem de 10mg/kg de peso corporal e como anestésico o Vertanacol (Fort Dodge, Iowa-EUA), a base de cloridrato de ketamina a 5% na dosagem de 25mg/Kg de peso corporal.

A conduta anestésica seguiu a tabela peso/dosagem utilizada pela disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba–UNESP - em Experimentação de animais (ANEXO 2).



### 1.3.7 Procedimentos cirúrgicos

A) Para a realização das intervenções cirúrgicas, os animais foram inicialmente pesados, sedados com injeção intramuscular de Dopaser, e em seguida anestesiados com Vertanacol. O período de trabalho com cada animal não ultrapassou 5 minutos e para não haver necessidade de complementação anestésica.

B) Após a anestesia, foi feita a tricotomia da região dorsal e a lavagem da área com a finalidade de se evitar contaminação do campo cirúrgico pela presença de pêlos. A anti-sepsia da área desprovida de pêlos foi efetuada esfregando por dois minutos com gaze em solução aquosa 10% de PVPI (Áster Produtos Médicos, Sorocaba - Brasil). Em seguida, iniciou-se o procedimento cirúrgico, fazendo-se uma incisão com lâmina de bisturi número 15 (Shangai – Méd. Sn Shangai – China.), no dorso do animal, (tendo a coluna vertebral como linha média de marcação). Após a divulsão do tecido subcutâneo para o lado esquerdo e direito um tubo contendo um dos materiais foi colocado em cada bolsa e mais um tubo vazio a uma distância de 2 cm do tubo já implantado com auxílio de pinça reta. Assim, cada animal recebeu três tubos, dois com os materiais a serem testados (CPM<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> Cinza) e um controle (tubo vazio). O tecido foi suturado com fio de seda (4,0) (Ethicon Inc., San Ângelo - EUA.) não reabsorvível e anti-sepsia final, foi realizada com PVPI 10%.

Os animais foram acompanhados até se recuperarem da anestesia antes de retornarem ao biotério.

### 1.3.8 Grupos experimentais

De acordo com os materiais empregados e tempos pós-operatórios os 30 ratos foram divididos em 3 grupos, sendo 2 grupos experimentais e 1 grupo controle. Cada grupo experimental foi composto de 6 animais para cada tempo pós-operatório (7,15,30,60 e 90 dias), distribuídos conforme a tabela 1:

**Tabela 1:** Divisão dos animais por 3 grupos

GRUPOS	MATERIAIS	TUBO	7 dias	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
A	Ángelus MTA	Polietileno	6	6	6	6	6
B	CPM	Polietileno	6	6	6	6	6
C	Vazio	Polietileno	6	6	6	6	6

### 1.3.9 Obtenções das peças

Os períodos de avaliação foram de 7, 15, 30, 60 e 90 dias. A cada tempo experimental, seis animais foram sacrificados por meio de uma dose excessiva de anestésico (cloridrato de ketamina - Fort Dodge, Iowa - EUA). Após o sacrifício, foi realizada novamente uma tricotomia da região dorsal, e anti-sepsia da área com PVPI 10%. Logo após, realizou-se uma nova incisão com lâmina de bisturi número 15, tendo a coluna vertebral como linha média de marcação, os tubos foram localizados e removidos juntamente com os tecidos que os envolvem.

### 1.3.10 Processamentos laboratoriais para análise histológica

Os espécimes deste grupo foram lavados em água corrente pelo período de 5 horas para remoção da solução de fixação e desidratados em álcool em concentrações crescentes: álcool 70% pelo período de uma noite, no dia seguinte, álcool 90% em 3 trocas de 30 minutos e álcool 95% em 3 trocas de 30 minutos.

Para o método de inclusão em glicol metacrilato foi utilizado o *Kit Historesin* (Leica, Germany), que é constituído de Solução A, Ativador e Solução B. As peças desidratadas foram então, colocadas na Solução A ativada e deixadas para infiltrar à temperatura ambiente por 72 horas, quando foram levadas para inclusão.

Para inclusão, moldes de plástico de 1,0 ml de capacidade foram cobertos com uma camada de Teflon em “spray”, o que impede a adesão do glicol metacrilato ao molde e controla o aquecimento durante a polimerização. Os moldes foram preenchidos pela solução de inclusão.

As peças foram colocadas no interior dos moldes já cobertos pelo Teflon para o preenchimento com a solução de inclusão. Cada molde foi coberto com resina autopolimerizável para evitar o contato do glicol metacrilato com o oxigênio do ar, pois este dificulta a reação normal da resina. Sob os moldes foi colocada uma barra de gelo para que a reação exotérmica possa ser controlada, desta forma, evita-se a formação de bolhas no interior da resina.

Aguardar-se-á 2 horas para que a polimerização se complete, depois os blocos de glicol metacrilato contendo os espécimes foram cortados com lâmina de tungstênio em micrótomo comum na espessura de 3 $\mu$ m, de forma longitudinal ao longo eixo do tubo.

Os cortes foram colocados diretamente sobre a lâmina contendo uma gota de água deionizada para que espalhem sem necessidade de passar por água quente e sem necessidade de albumina para prendê-los à lâmina. As secções foram coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina e Von Kossa com uma pequena modificação, ou seja, o tempo de permanência nas soluções foi aumentado devido a maior dificuldade do corante se difundir pela secção, haja vista que a resina não é removida durante o processo de coloração como é feito com a parafina.

### **1.3.11 Formas de análise dos resultados**

A análise histomorfológica qualitativa do processo inflamatório consistiu na descrição dos fenômenos inflamatórios observados microscopicamente nos cortes teciduais representativos de cada grupo e tempos pós-operatórios.

A análise quantitativa foi realizada por meio da atribuição de escores, graduando a importância dos fenômenos microscópicos observados separadamente. Foram realizadas a determinação das condições microscópicas das estruturas examinadas, em itens distintos, e avaliadas sob a forma de escores de 0 a 3, para resposta inflamatória. Cápsula fibrosa será considerada fina quando  $< 150\mu\text{m}$  e espessa quando  $> 150\mu\text{m}$ . Necrose e formação de calcificação foram registradas como presente ou ausente. Possibilitando, dessa maneira, dados objetivos para uma análise estatística posterior.

### **1.3.12 Formas de análise microscópica**

A análise microscópica foi realizada com auxílio de um microscópio binocular (Olympus Corporation Ina Plant, Ina – Japan.) e os resultados foram expostos por meio de duas análises, sendo uma qualitativa e a outra quantitativa referente a cada grupo e tempo pós-operatório.

### **1.3.13 Análises qualitativas**

A análise microscópica qualitativa do processo inflamatório da reação tecidual aos materiais retrobturadores consistiu na descrição dos fenômenos observados em cada grupo e tempos pós-operatórios.

### **1.3.14 Análises quantitativas**

A análise quantitativa foi realizada por meio da atribuição de escores, graduando a importância dos fenômenos microscópicos observados. A avaliação se deu sob a forma de escores de 1 a 3, possibilitando dessa maneira, dados para uma análise estatística posterior. Além disso, com o objetivo de avaliar a presença de mineralização de cada material analisado, as lâminas foram avaliadas pelos escores sim (presença) ou não (ausência de mineralização) (Tabela 2).

**Tabela 2:** Escores utilizados na análise quantitativa

Escore	Definição
1- Leve	Inferior a 10 células; cápsula sem diferenciação da lateral; de 1 a 5 vasos sanguíneos na embocadura.
2- Moderado	Entre 10 e 25 células; cápsula ligeiramente mais espessa que a lateral; de 6 a 10 vasos sanguíneos na embocadura.
3- Severo	Superior a 25 células; cápsula significativamente mais espessa que a lateral (desorganização do tecido); mais que 10 vasos sanguíneos na embocadura.
Mineralização	O critério de avaliação para a mineralização, foi avaliado em cada lamina, e observado apenas a presença ou não presença.

### 1.3.15 Análises estatísticas

A avaliação microscópica dos cortes teciduais mais representativos de cada grupo e tempo pós-operatório foram realizados por dois observadores e os dados encontrados foram submetidos à análise estatística pelo teste de *Kruskal Wallis*.

*Resultados*

*Resultados*



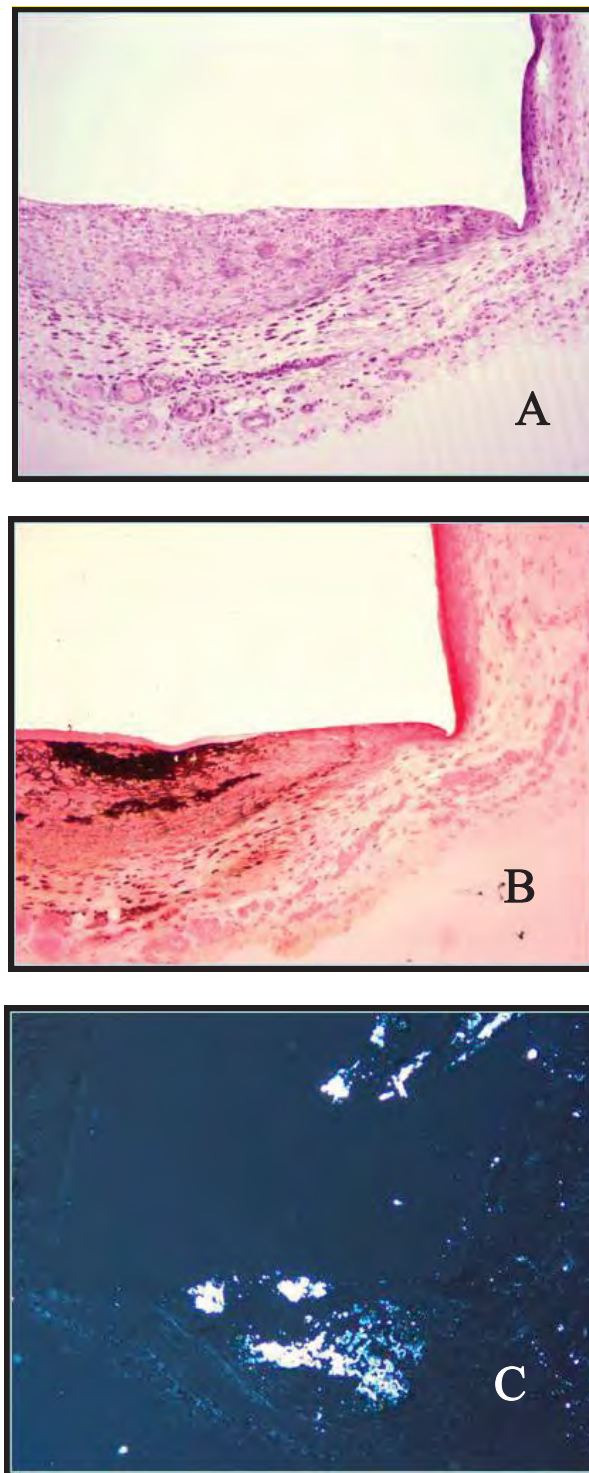


## 1.4 Resultados

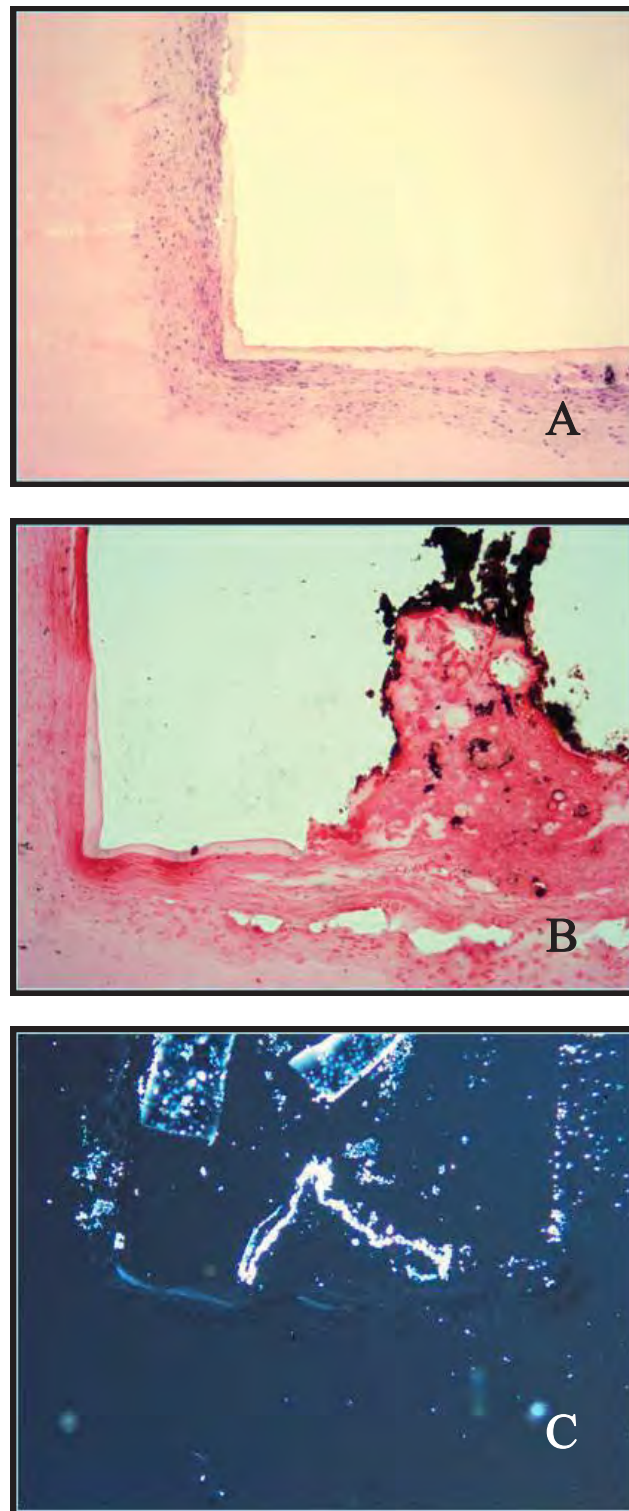
### 1.4.1 Análises Qualitativas

#### 1.4.1.1 Ângelus MTA®

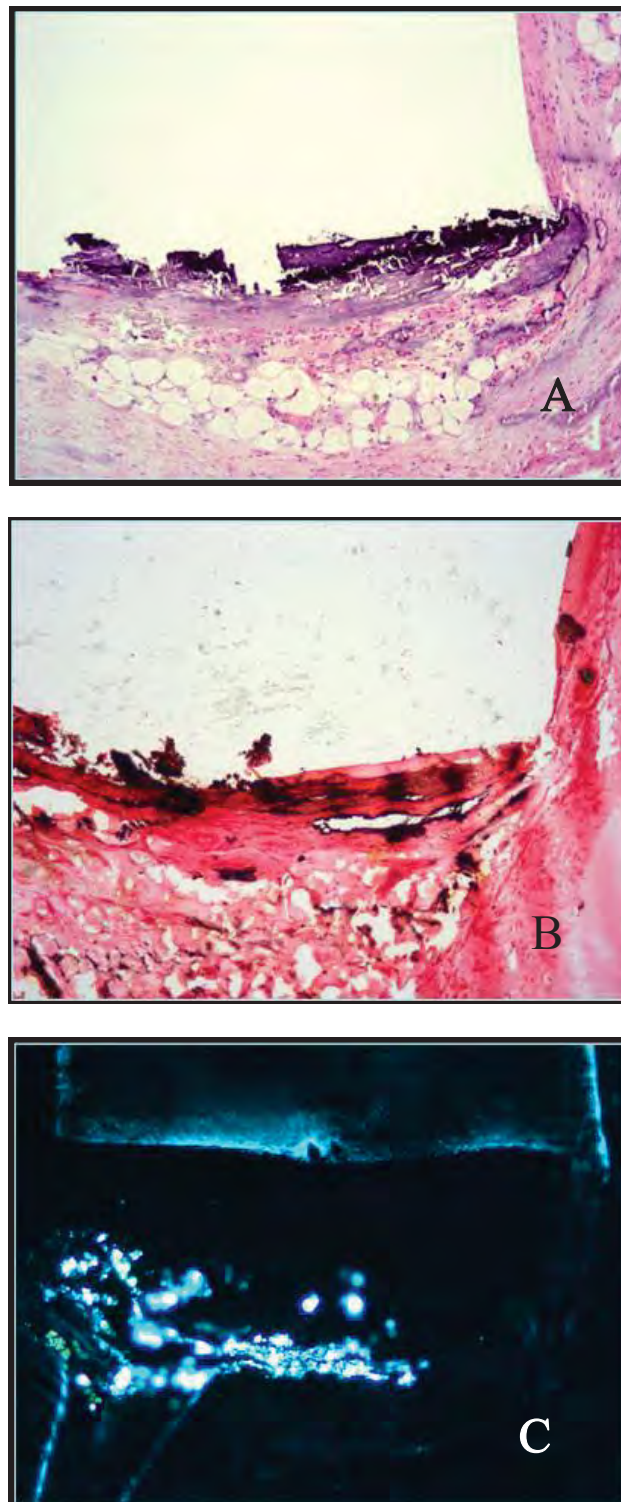
No 7° dia, um infiltrado celular inflamatório moderado consistindo de linfócitos e macrófagos estavam presentes na cápsula fibrosa (Fig.1A). A intensidade da inflamação reduziu no 15°, 30°, 60° e 90° dias com uma cápsula fibrosa fina próxima do tubo e poucas células inflamatórias (Fig. 2A, Fig. 3A, Fig. 4A, Fig. 5A). Granulações birrefringentes para luz polarizada e Von Kossa positivo foram observadas próximas da abertura dos tubos (Fig.1B, Fig.1C, Fig. 2B, Fig.2C, Fig.3B, Fig.3C, Fig. 4B, Fig.4C, Fig.5B, Fig.5C).



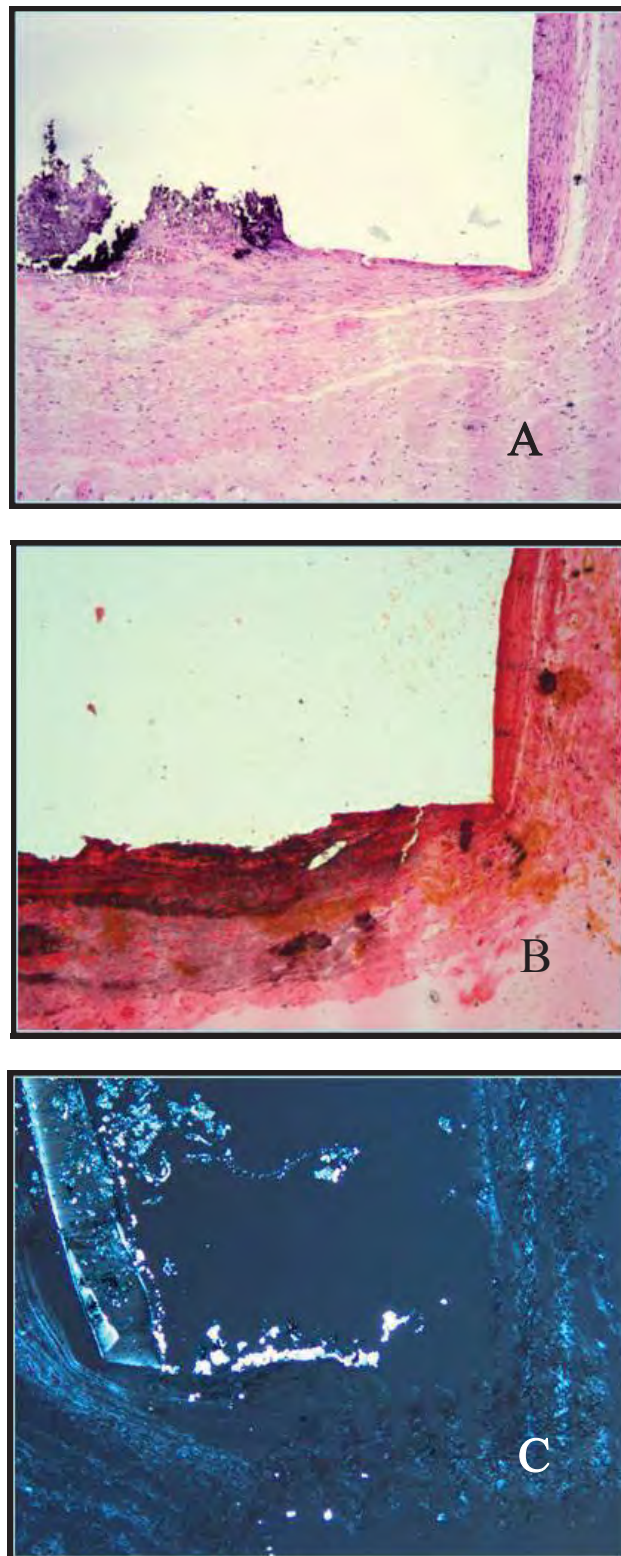
**Figura 1** – (A) Grupo MTA, H. E, 10X, 7 dias.(B) Grupo MTA, V.K., 10X, 7 dias.(C) MTA Luz Polarizada, 10X, 7 dias.



**Figura 2 – (A)** Grupo MTA, H. E, 10X, 15 dias. **(B)** Grupo MTA, V.K., 10X, 15 dias **(C)** Grupo MTA, Luz Polarizada, 10X, 15 dias.

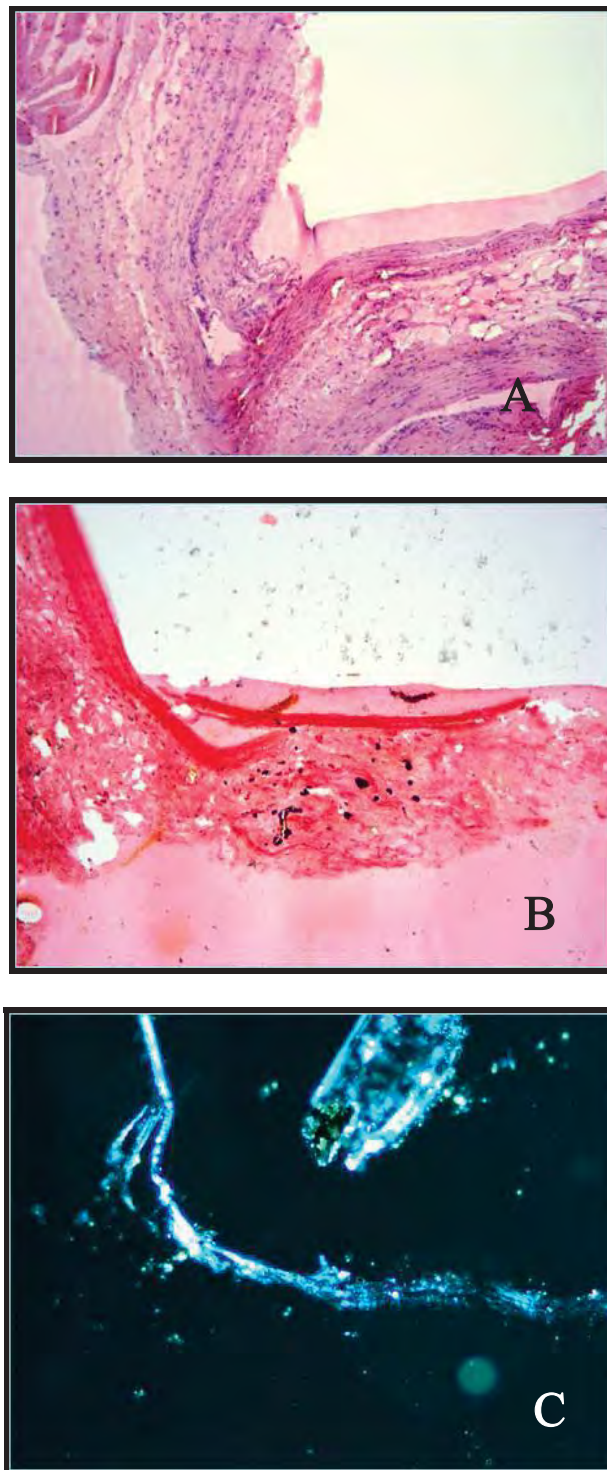


**Figura 3** –(A) Grupo MTA, H. E, 10X, 30 dias. (B) Grupo MTA, V.K., 10X, 30 dias (C) Grupo MTA, Luz Polarizada, 10X, 30 dias



**Figura 4** –(A) Grupo MTA, H. E., 10X, 60 dias (B) Grupo MTA, V.K., 10X, 60 dias (C) Grupo MTA, Luz Polarizada, 10X, 60 dias.



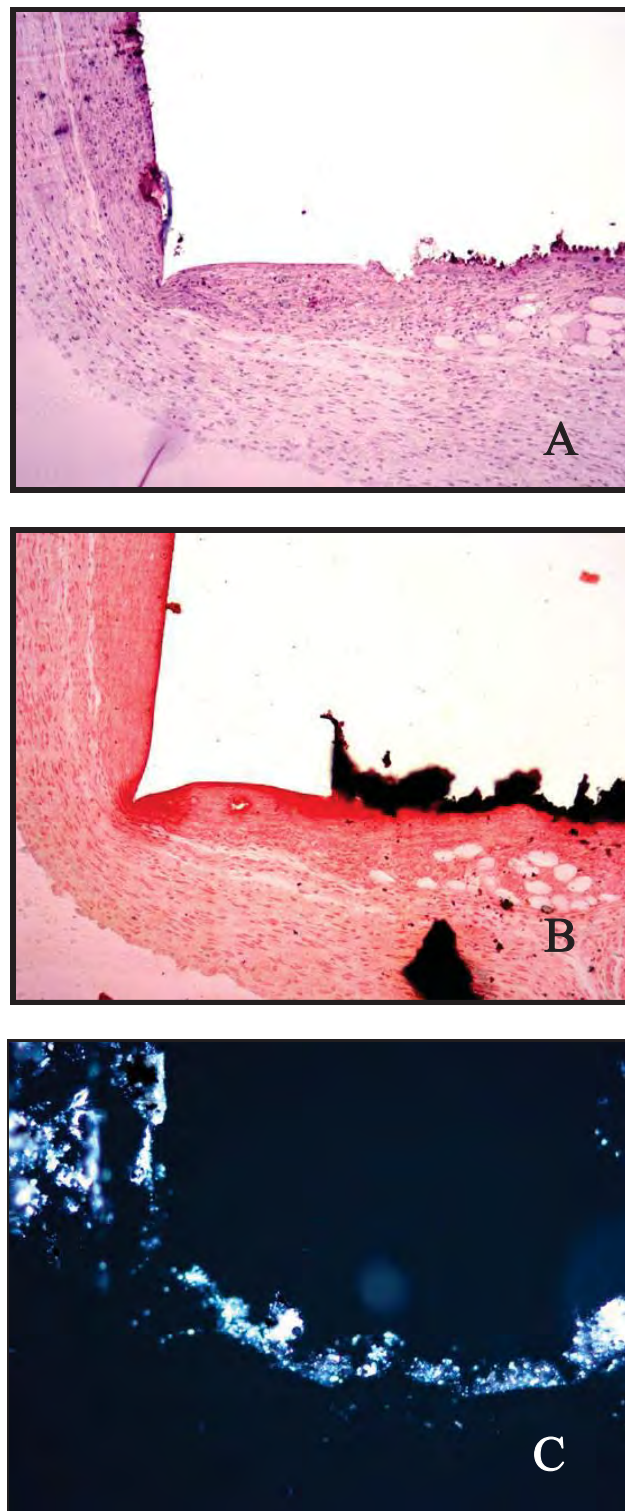


**Figura 5** –(A) Grupo MTA, H. E, 10X, 90 dias (B) Grupo MTA, V.K., 10X, 90 dias (C) Grupo MTA Luz Polarizada, 10X, 90 dias.

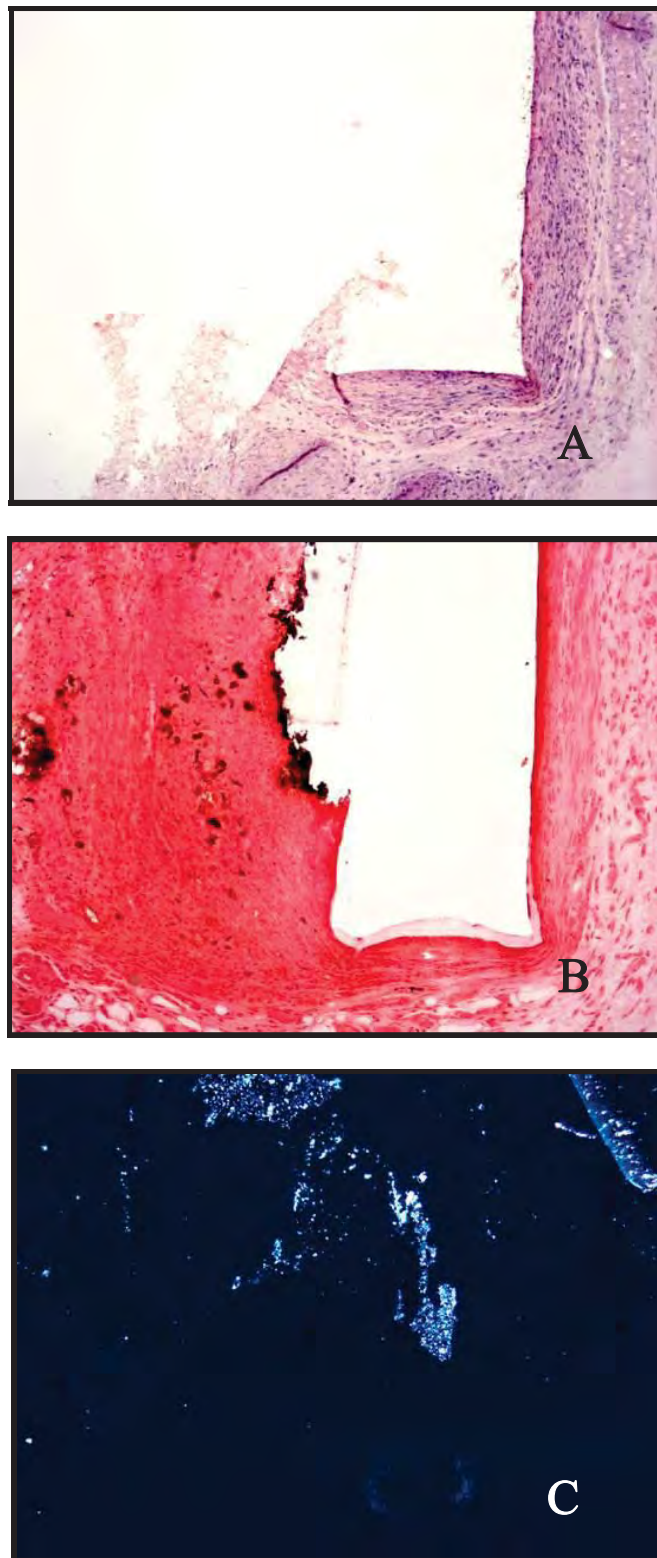
#### 1.4.1.2 CPM

No 7° e 15° dias, um infiltrado celular inflamatório moderado consistindo de linfócitos e macrófagos estavam presentes na cápsula fibrosa (Fig. 6A, Fig.7A). A intensidade da inflamação e a espessura da cápsula fibrosa foram reduzidas no 30° dia, similar ao grupo Controle (Fig.8A). No 60° e 90° dias, poucas células inflamatórias crônicas consistindo de linfócitos, macrófagos, fibroblastos estavam presentes na fina cápsula fibrosa (Fig.9A, Fig.10A). Granulações birrefringentes para luz polarizada e Von Kossa positivo foram observadas em íntimo contato com o CPM (Fig. 6B, Fig.6C, Fig. 7B, Fig.7C, Fig.9B, Fig.9C, Fig.10B, Fig.10C). Um fato interessante foi à observação de invaginação de tecido para o interior do tubo para muitos dos espécimes examinados denotando uma alta solubilidade do material (Fig.8A, Fig.8B, Fig. 8C).

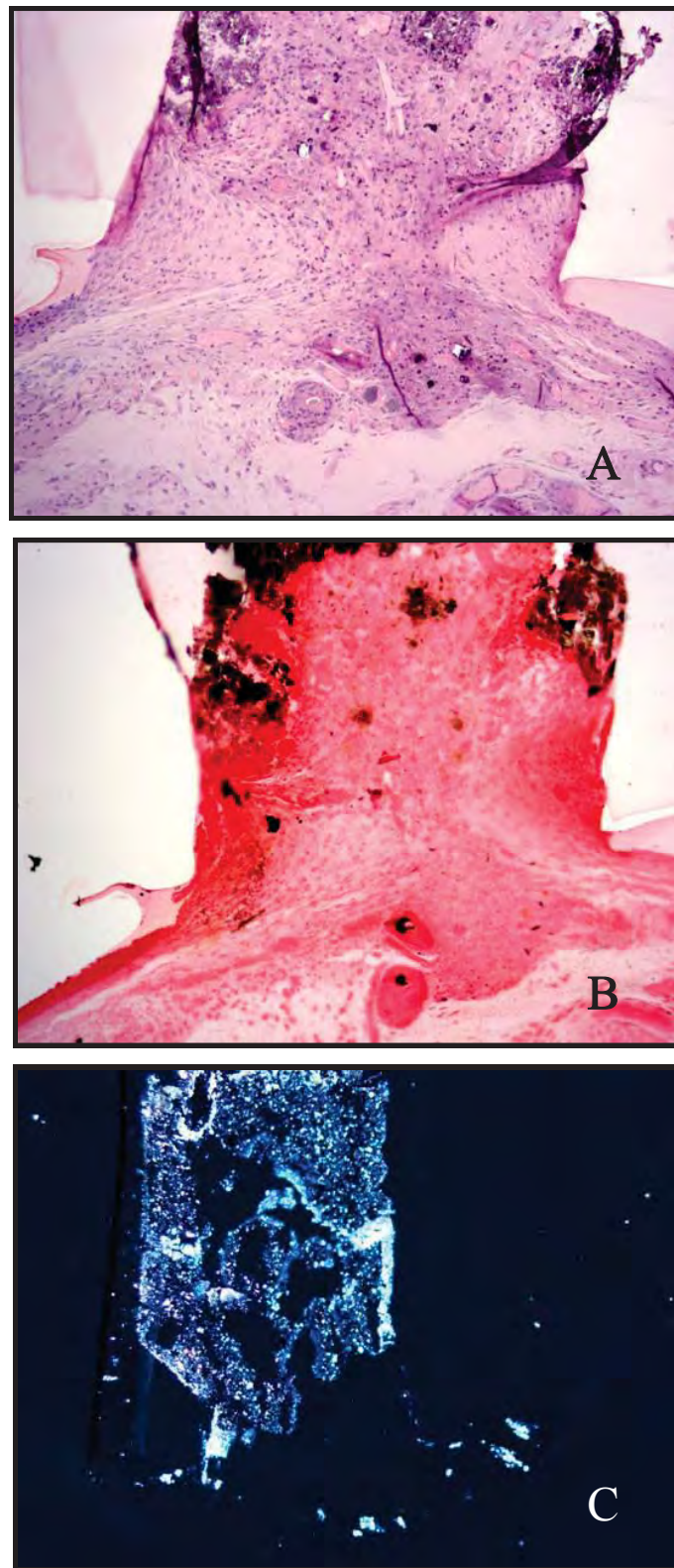




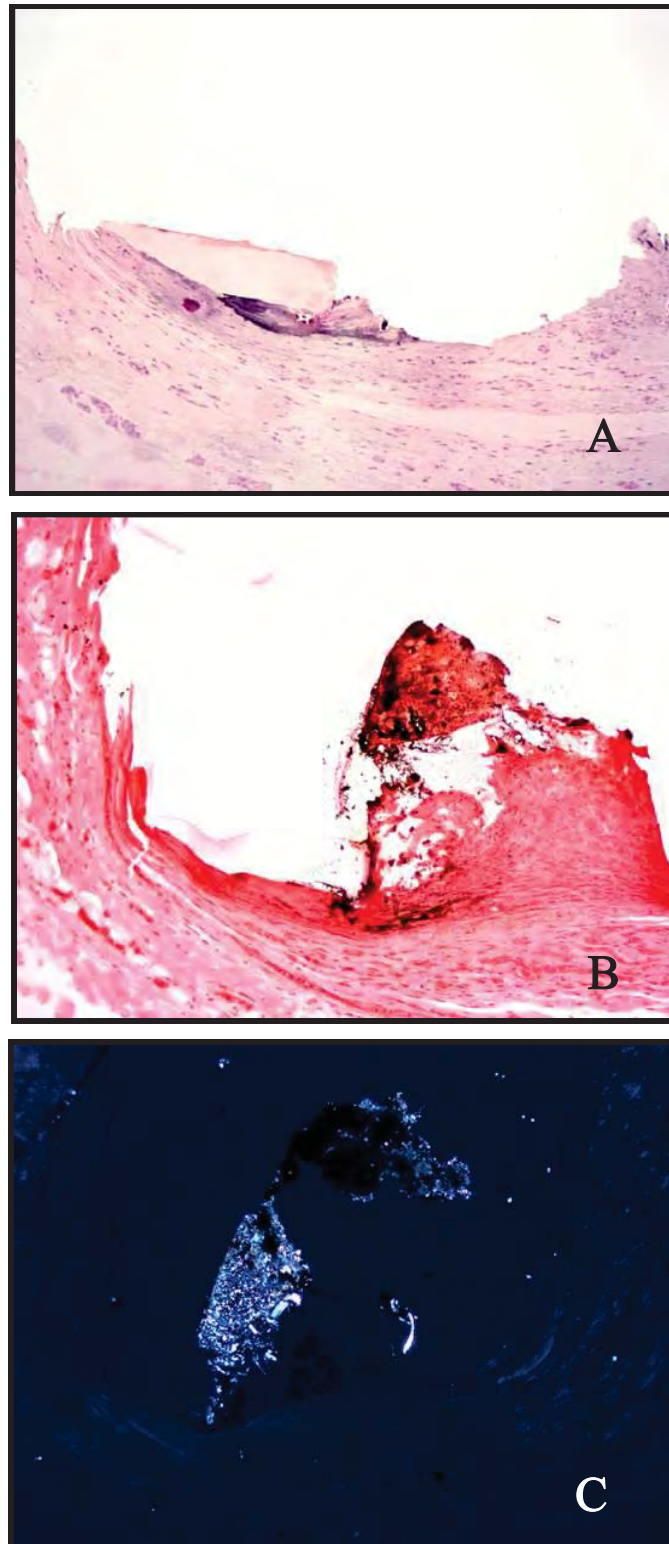
**Figura 6** –(A) Grupo CPM, H. E, 10X, 7 dias. (B) Grupo CPM, V.K., 10X, 7 dias (C) Grupo CPM Luz Polarizada, 10X, 7 dias.



**Figura 7** –(A) Grupo CPM, H. E, 10X, 15 dias (B) Grupo CPM, V.K., 10X, 15 dias.  
(C) Grupo CPM Luz Polarizada, 10X, 15 dias.

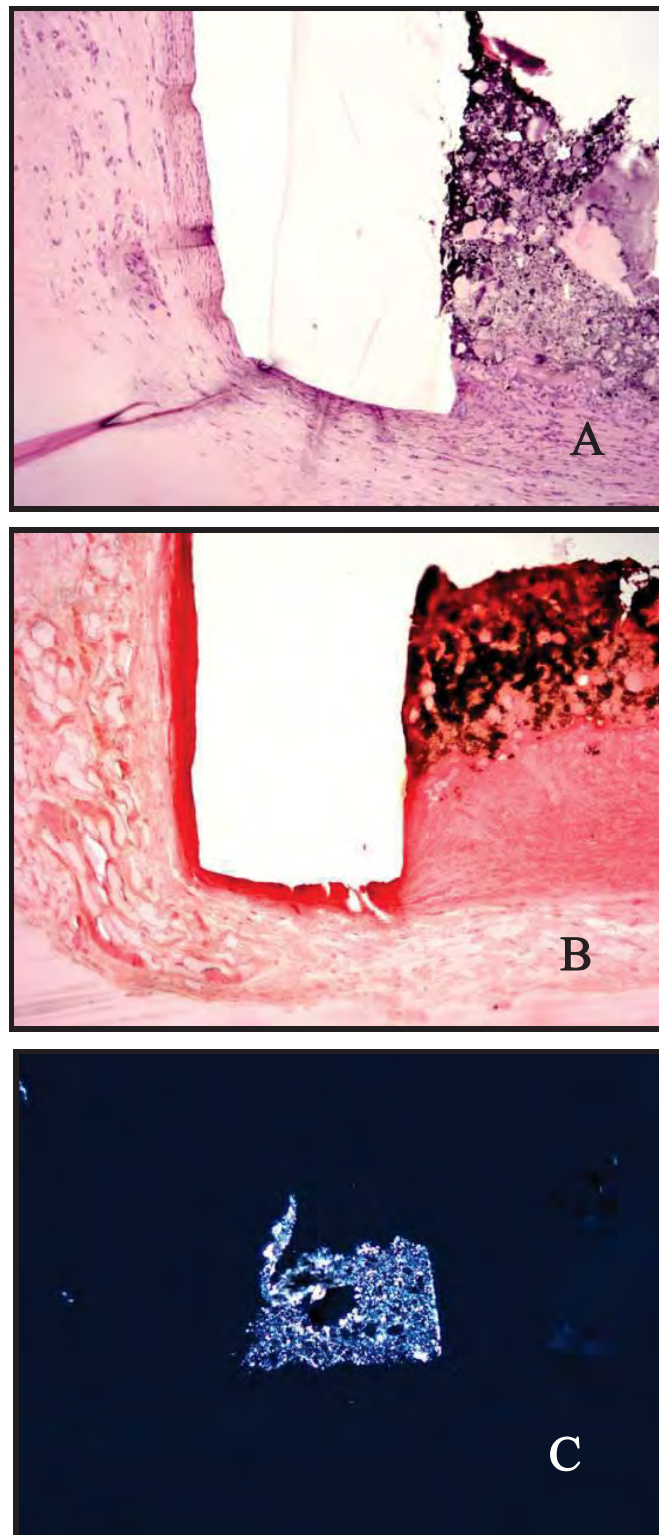


**Figura 8** –(A) Grupo CPM, H. E, 10X, 30 dias. (B) Grupo CPM, V.K., 10X, 30 dias.  
(C) Grupo CPM Luz Polarizada, 10X, 30 dias.



**Figura 9** –(A) Grupo CPM, H. E, 10X, 60 dias (B) Grupo CPM, V.K., 10X, 60 dias.  
(C) Grupo CPM Luz Polarizada, 10X, 60 dias



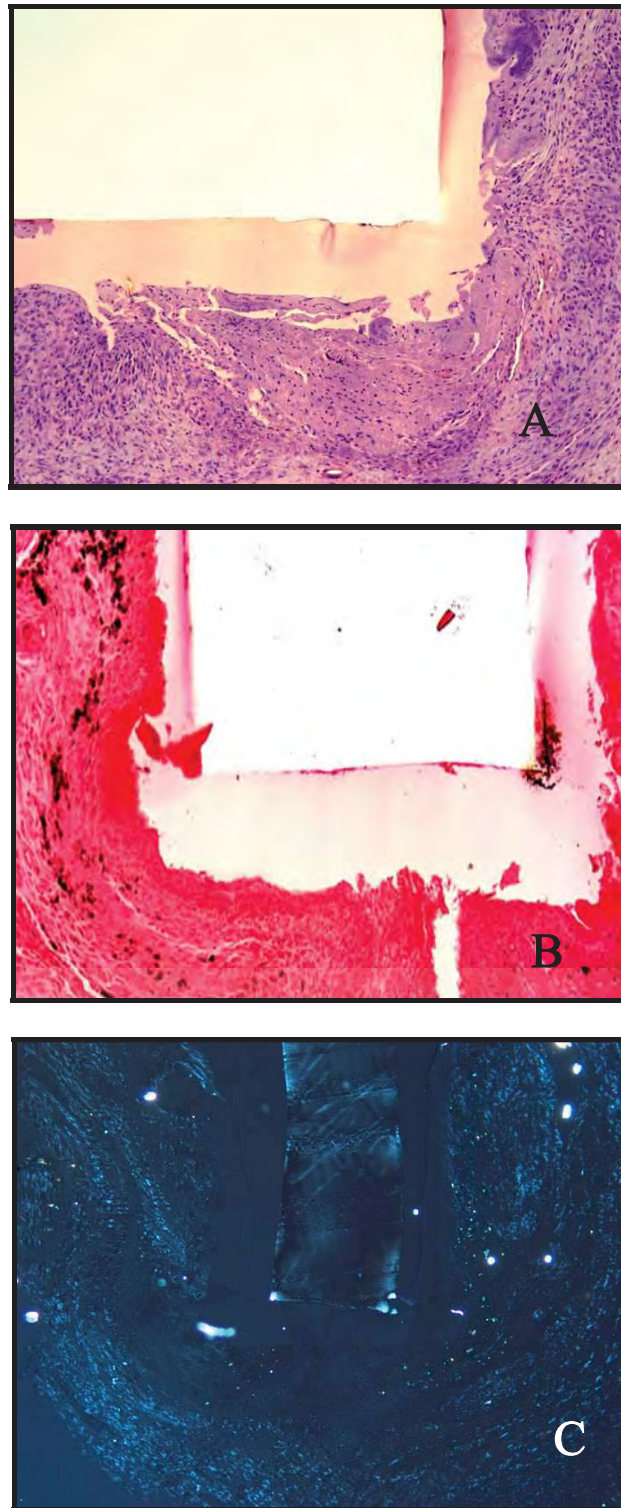


**Figura 10** –(A) Grupo CPM, H. E, 10X, 90 dias. (B) Grupo CPM, V.K., 10X; 90 dias.  
(C) Grupo CPM Luz Polarizada, 10X, 90 dias

#### 1.4.1.3 Controle (tubos vazios)

No 7° e 15° dias, um infiltrado celular inflamatório moderado consistindo de linfócitos e macrófagos estavam presentes na cápsula fibrosa (Fig. 11A, Fig.12A). A cápsula fibrosa em volta do tubo estava fina com poucas células inflamatórias crônicas no 30°, 60° e 90° dias (Fig. 13A, Fig.14A, Fig. 15A). O grupo Controle não foi positivo para coloração de *Von Kossa* e não foram observadas estruturas birrefringentes para luz polarizada (Fig.11B, Fig.11C, Fig. 12B, Fig.12C, Fig.13B, Fig.13C, Fig. 14B, Fig.14C, Fig.15B, Fig.15C)

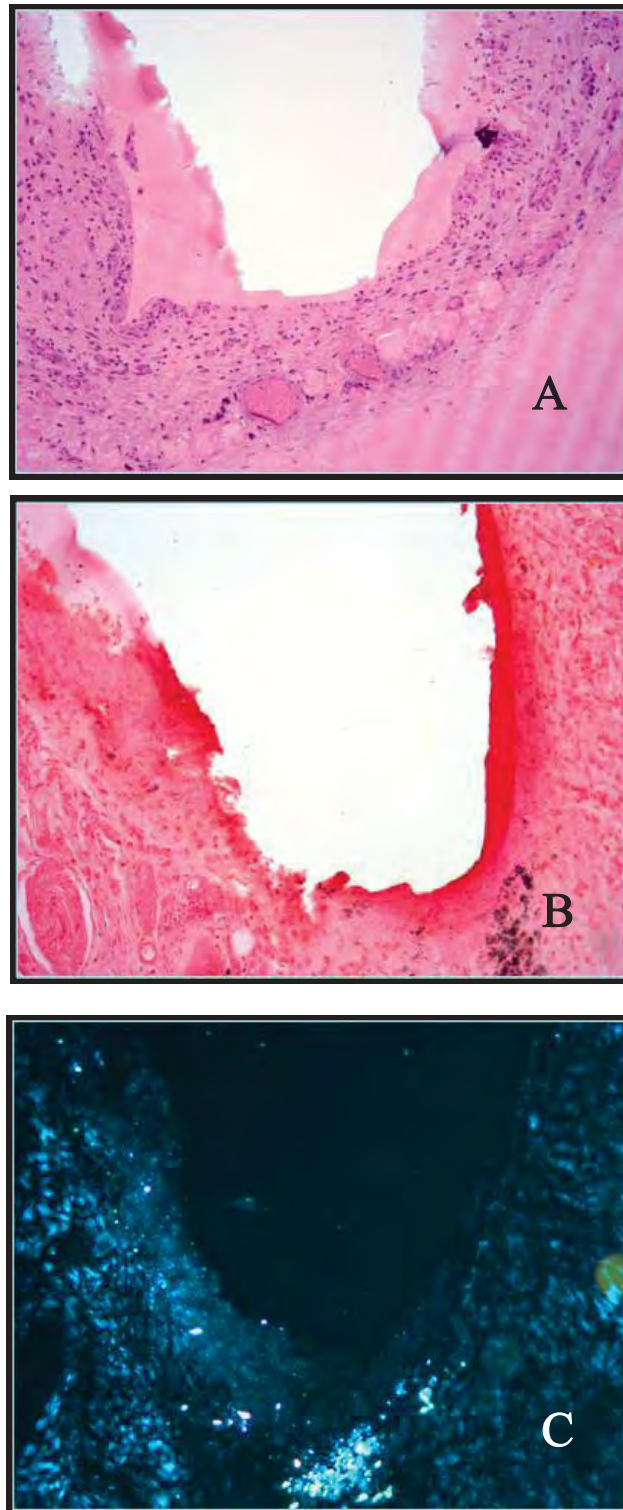




**Figura 11** –(A) Grupo Controle, H. E, 10X, 7 dias.(B) Grupo Controle, V.K., 10X, 7 dias  
(C) Grupo Controle Luz Polarizada, 10X, 7 dias.

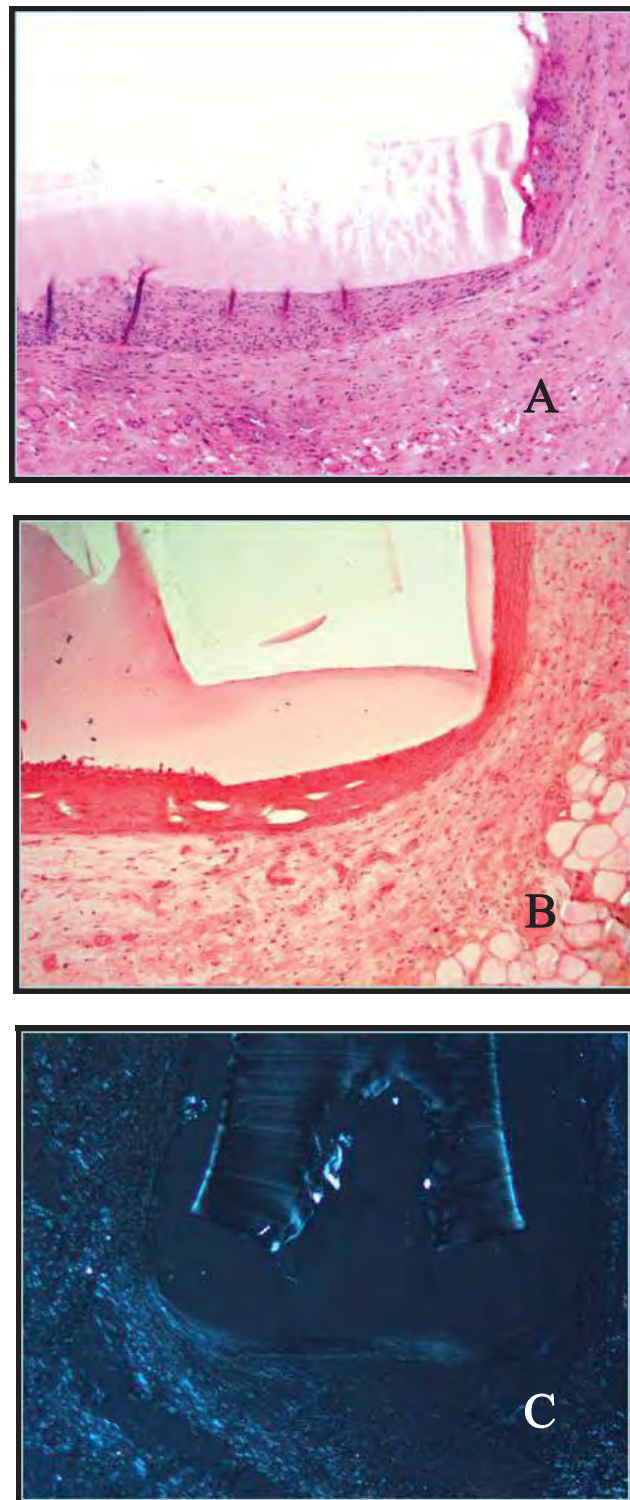


**Figura 12** –(A) Grupo Controle, H. E, 10X, 15 dias. (B) Grupo Controle, V.K., 10X, 15 dias  
(C) Grupo Controle Luz Polarizada, 10X, 15 dias.

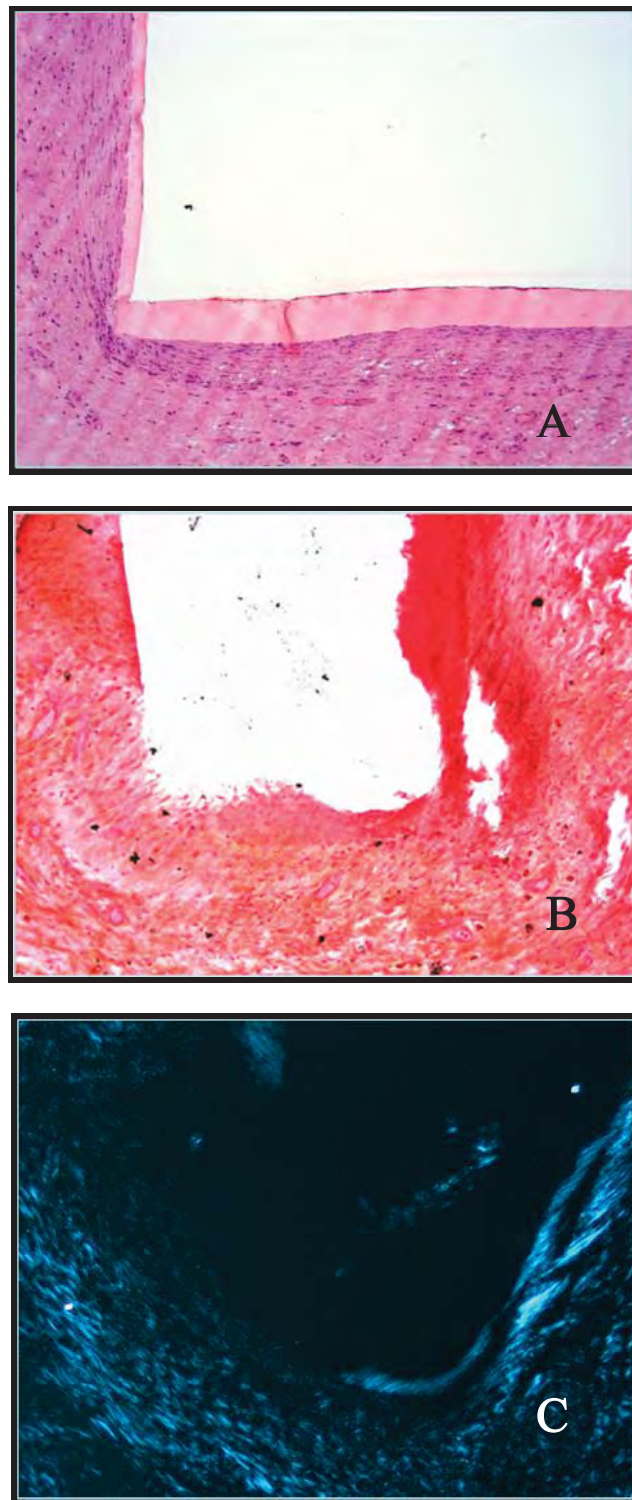


**Figura 13** –(A) Grupo Controle, H. E, 10X 30 dias (B) Grupo Controle, V.K., 10X, 30 dias  
(C) Grupo Controle Luz Polarizada, 10X, 30 dias





**Figura 14** –(A) Grupo Controle, H. E, 10X, 60 dias (B) Grupo Controle, V.K., 10X, 60 dias  
(C) Grupo Controle Luz Polarizada, 10X, 60 dias



**Figura 15** –(A) Grupo Controle, H. E, 10X, 90 dias (B) Grupo Controle, V.K., 10X, 90 dias (C) Grupo Controle Luz Polarizada, 10X, 90 dias.

#### 1.4.1.4 Análise quantitativa

##### Comparação entre os grupos

Os dados foram comparados em cada período experimental e estão presentes na Tabela 3:

**Tabela 3: Comparação entre os grupos.**

MATERIAL	SCORE					
	TEMPO	0	1	2	3	Calcificação
	<b>7 dias</b>					
	MTA	0	0	100	0	100
	CPM	0	0	100	0	100
	Controle	0	0	100	0	0
	<b>15 dias</b>					
	MTA	0	100	0	0	100
	CPM	0	0	100	0	100
	Controle	0	0	100	0	0
	<b>30 dias</b>					
	MTA	0	100	0	0	100
	CPM	0	90	10	0	100
	Controle	0	90	10	0	0
	<b>60 dias</b>					
	MTA	0	100	0	0	100
	CPM	0	100	0	0	100
	Controle	0	100	0	0	0
	<b>90 dias</b>					
	MTA	0	100	0	0	100
	CPM	0	100	0	0	100
	Controle	0	100	0	0	0



### **7 Dias**

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os escores dos diferentes grupos (média do escore de 2) ( $P>0.05$ ).

### **15 Dias**

Houve diferença estatisticamente significativa entre o número de células inflamatórias do Ângelus<sup>®</sup> MTA e dos outros grupos (média do escore de 2) ( $P<0.05$ ).

### **30 Dias**

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os escores dos diferentes grupos (média do escore de 1) ( $P>0.05$ ).

### **60 Dias e 90 Dias**

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os escores dos diferentes grupos (média do escore de 1). ( $P>0.05$ ).

*Discussão*

*Discussão*



## 1.5 Discussão

As propriedades físicas, capacidade de selamento, biocompatibilidade e desempenho clínico do MTA têm sido avaliados através de estudos clínico e laboratoriais. O MTA não é apenas biocompatível, mas também apresenta um desempenho biológico quando utilizado para selamento radicular, reparos de perfurações, pulpotomias e tratamentos de apicificações (27).

As reações aos tubos vazios neste estudo provocaram reações nos tecidos conjuntivos, demonstrando assim resultados semelhantes a outros trabalhos na literatura previamente relatados (22, 26,28).

Neste estudo o Ângelus MTA<sup>®</sup> cinza apresentou resposta inflamatória crônica moderada aos 7 dias pós operatório, reação que reduziu ao tempo, sendo observado através de uma cápsula fibrosa fina que envolve todo o tubo. Durante todos os períodos de tempo, áreas de Von Kossa positivas para cálcio e de estruturas birrefringentes à luz polarizada foram observadas para todas as amostras, que foram semelhantes aos resultados previamente já relatados (6,29).

O MTA tem óxido de cálcio e fosfato de cálcio em sua formulação. O óxido de cálcio pode reagir com água ou fluidos do tecido, formando hidróxido de cálcio, que em contato com a água, se dissociam em íons cálcio e hidroxila. Os íons cálcio reagem com o dióxido de carbono nos tecidos e carbonato de cálcio formando granulações presentes como cristais de calcita birrefringentes à luz polarizada (24), o que estimularia a deposição de tecido duro.

Segundo o fabricante o CPM<sup>®</sup> tem propriedades semelhantes em relação ao MTA e mesma indicação clínica (2). Neste estudo, os resultados observados com

CPM<sup>®</sup> foram similares aos dos grupos controle e MTA, mostrando uma resposta inflamatória crônica moderada nos períodos iniciais, que reduziu com o tempo. Áreas de Von Kossa positivas e estruturas birrefringentes sob luz polarizada, também foram observadas mostrando que este material estimulou a formação de tecido mineralizado no tecido subcutâneo de ratos observados também no MTA (24). Um fato interessante observado neste estudo foi que muitos dos espécimes examinados apresentaram a invaginação do tecido para o interior dos tubos, demonstrando assim uma alta solubilidade do material. Um material com alta solubilidade, não é adequado ao tratamento endodôntico, pois tal característica promove o insucesso do tratamento endodôntico. O resultado de solubilidade tem relação com resultados anteriores, que mostrou pior selamento do CPM<sup>®</sup> em relação ao Ângelus MTA<sup>®</sup> cinza quando usado como plug apical (16).

Em conclusão, os resultados observados com o CPM<sup>®</sup> foram semelhantes aos encontrados pelo Ângelus MTA<sup>®</sup> cinza, exceto os relacionados com a solubilidade. Outros estudos são necessários para melhor analisar o comportamento deste material.

*Conclusão*

*Conclusão*



## 1.6 Conclusão

Concluiu-se com base na metodologia empregada que:

- 1- O CPM<sup>®</sup> obteve resposta tecidual semelhante em relação ao Ângelus MTA<sup>®</sup> cinza.
- 2- O Ângelus MTA<sup>®</sup> cinza e CPM demonstraram áreas de mineralização.
- 3- O CPM<sup>®</sup> permitiu a invaginação dos tecidos para o interior do tubo denotando uma alta solubilidade do material.





*Referências*

*Referências*



## 1.7 Referências

1. Howard W R, Jeffrey M T, David W B, David G C. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: A review of the literature. *Dent Mater J* 2008;24:149-64.
2. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993;19:541-4.
3. Schmitt D, Bogen G. Multifaceted use of ProRoot MTA root canal repair material. *Pediatr Dent* 2001;23:326-30.
4. Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of Mineral Trioxide Aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995;79:56-63.
5. Bernabe PF, Holland R, Morandi R, et al. Comparative study of MTA and other materials in retrofilling of pulpless dogs' teeth. *Braz Dent J* 2005;16:149 -55.
6. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabé PFE, Costa MTM. A Mineral Trioxide aggregate sealer stimulated mineralization. *J Endod* 2009;35:256-60.
7. Menezes R, Bramante CM, Letra A, Carvalho VG, Garcia RB. Histologic evaluation of pulpotomies in dog using two types of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements as wound dressings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98:376-9.
8. Oliveira TM, Sakai VT, Silva TC, Santos CF, Abdo RC, Machado MA. Mineral trioxide aggregate as an alternative treatment for intruded permanent teeth with root resorption and incomplete apex formation. *Dent Traumatol* 2008;24:565-8.
9. Hwang YC, Lee SH, Hwang IN, Kang IC, Kim MS, Kim SH, Son HH, Oh WM. Chemical composition, radiopacity, and biocompatibility of Portland cement with bismuth oxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:96-102.
10. Funteas UR, Wallace JA, Fochtman EW. A comparative analysis of mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Aus Endod J* 2003;29:43-4.
11. Holland R, Souza V, Nery MJ, Faraco IM Jr, Bernabe PF, Otoboni Filho JA, Dezan E Jr. Reaction of rat tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J* 2001;12:3-8.

12. Saidon J, He J, Zhu Q, Safavi K, Spangberg LS. Cell and tissue reactions to mineral trioxide aggregate and Portland cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95:483-9.
13. Dammaschke T, Gerth HUV, Züchner H, Schäfer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dent Mater* 2005;21:731–8.
14. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995;21:349–53.
15. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Pitt Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater* 2005;21:297–303.
16. Orosco F A, Bramante C M, Garcia R B, Bernardineli N, Moraes I G. Sealing ability of Gray MTA Angelus™, CPM™ and MBPC used as apical plugs. *J Appl Oral Sci* 2008;16:50-4.
17. Duarte MAH, Demarchi ACCO, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga SC. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95:345-7.
18. Bramante CM, Bramante AS, Moraes IG, Bernardineli N, Garcia RB. CPM es MTA: nuevos materiales de uso en endodoncia – experiências clinicas en el manejo de los materiales. *Rev Fac Odontol* 2006;17:7-10.
19. Vasconcelos B C, Bernardes R A, Cruz S M L, Duarte M A H, Padilha P M, Bernardineli N, Garcia R B, Bramante C M, Moraes I G. Evaluation of pH and calcium ion release of new root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:135-39.
20. Bramante CM, Bramante AS, Moraes IG, Bernardineli N, Garcia B. CPM es MTA: nuevos materiales de uso en endodoncia— exemplos clinicos en el manejo de los materiales. *Rev Fac Odontol* 2006;17:7-10.
21. American National Standards Institute/Revised American National Standards Institute American Dental Association. Document No. 41. For recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. 1979. New York, NY: American National Standards Institute.
22. Federation Dentaire International Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Federation Dentaire International Commission on Dental Materials, Equipment, and Therapeutics. (1980) Part 4.11: Subcutaneous implantation test. *Int Dental J* 1980;30:173– 4.

23. Gomes Filho JE, Gomes BPFA, Zaia AA, Novaes PD, Souza Filho FJ. Glycol Methacrylate: An alternative method for embedding subcutaneous implants. *J Endod* 2001;27:266–8.
24. Holland R, Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan Junior E. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod* 1999;25:161– 6.
25. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod* 2004;30:95–9.
26. Costa CA, Teixeira HM, do Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of two current adhesive resins. *J Endod* 2000;26:512– 6.
27. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod* 2010;36:190-202.
28. Ozbas H, Yaltirik M, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to compomers, composite and amalgam root-end filling materials. *Int Endod J* 2003;36:281–7.
29. Gomes-Filho JE, de Faria MD, Bernabé PF, et al. Mineral trioxide aggregate but not light-cure mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. *J Endod* 2008;34:62–5.

# Capitulum II

Capitulum II



# *Capítulo 2*

*Max Douglas Faria – Doutorado Unesp* 



*Avaliação da citotoxicidade do Ângelus  
MTA® Cinza e CPM® Cimento Portland  
Modificado. Análise em cultura de  
fibroblastos.*





*Resumo*

*Resumo*



## Resumo

FARIA, MD. **Avaliação da Citotoxicidade do Ângelus MTA<sup>®</sup> Cinza e CPM<sup>®</sup> Cimento de Portland Modificado. Análise em cultura de fibroblastos.** Araçatuba, 2010. 117 f. Tese (Doutorado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do CPM (EGEO SRL, Buenos Aires, Argentina) uma nova fórmula de cimento Portland comparando-a com o Ângelus MTA (Ângelus Londrina, Brasil) sobre a viabilidade celular e a produção de citocinas (interleucina IL-6 e IL-1 $\beta$ ) por fibroblastos de camundongos. **Material e Métodos:** Foram inseridas placas de cultura Millipore com tubos de polietileno preenchidos com os materiais em 24 poços com cultura de células de fibroblastos de camundongo. Células cultivadas apenas com tubos de polietileno vazios foram utilizadas como controle. Após 24 horas, o ensaio MTT foi utilizado para avaliar a viabilidade celular. Para dosagem de citocinas, fibroblastos de camundongo foram incubados por 24hs em placas de fundo liso com discos dos materiais fixados na parte inferior. Células cultivadas sem os discos de material serviram de controle negativo. Após 24 horas de incubação, meio de cultura foi coletado para avaliação de citocinas, utilizando um ensaio de Elisa. Os dados foram analisados estatisticamente pela análise de variância e correção de Bonferroni. **Resultados:** CPM<sup>®</sup> e Ângelus<sup>®</sup> MTA não inibiram a viabilidade celular. Ambos os materiais induziram a liberação de IL-6 e IL-1 $\beta$ , mas a quantidade não foi estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

Palavras-chave: cultura celular; citocinas, citotoxicidade; MTA; CPM

*Abstract*

*Abstract*



## *Abstract*

FARIA, MD **Effects of Retrograde Filling Materials on Fibroblast Viability and Cytokine Production.** Araçatuba, 2010. 117 f. Thesis (Doctorate in Dentistry) - Faculty of Dentistry, Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho ".

The aim of this study was to investigate the effects of CPM (EGEO SRL, Buenos Aires, Argentina) a new Portland formulation comparing it to Angelus MTA (Angelus, Londrina, Brazil) on cell viability and cytokine (interleukin IL-1 $\beta$  and IL-6) production by mouse fibroblasts. **Methods:** Millipore culture plate inserts with polyethylene tubes filled with materials were placed into 24-well cell culture plates with mouse fibroblasts. Cells cultured with only empty polyethylene tubes were used as the control. After 24 hours, 3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay was used to evaluate the cell viability. For cytokine assay, mouse fibroblasts were incubated in 24- well flat-bottom plates with set material disks at the bottom. Cells cultured without the material disks served as the negative control. After 24 hours of incubation, culture media were collected for cytokine evaluation by using an enzyme-linked immunosorbent assay. The data were statistically analyzed by analysis of variance and Bonferroni correction. **Results:** CPM and Angelus MTA did not inhibit the cell viability. Both materials induced IL-6 and IL-1 $\beta$  releasing but the amount was not statistically significant compared with the control group. **Conclusions:** Both materials were not considered cytotoxic in fibroblast culture.

**Key Words:** Cell culture; cytokine; cytotoxicity; MTA; CPM



*Introdução*

*Introdução*



## 2.1 Introdução

O agregado de trióxido mineral (MTA) foi desenvolvido por Torabinejad no início de 1990, o primeiro estudo sobre esse material foi publicado por Lee et al. (1). Os principais componentes do MTA são: óxido tricálcico, silicato tricálcico, óxido de bismuto, aluminato tricálcico, aluminoferrite tetracalcium e óxido de silicato e foi criado para ser utilizado em perfurações patológicas ou iatrogênicas da raiz. Atualmente é considerado o material de escolha para o reparo de perfurações de raiz (1, 2, 3, 4, 5).

Estudos têm demonstrado que o MTA promove reações teciduais favoráveis que se caracterizam pela ausência de resposta inflamatória, a presença de uma cápsula fibrosa, e a indução de formação de tecido de reparação mineralizado (6-8). No entanto, o MTA tem propriedades de trabalho que não são ideais. O cimento resultante da mistura do pó com a água é difícil de manipular (9), e seu tempo de presa foi de quase 3 horas, enquanto o tempo de trabalho inferior a 4 minutos (10). Umidade adicional é também necessária para ativar a presa do cimento (9,11).

Em 2004, o CPM<sup>®</sup> foi desenvolvido na Argentina (Egeo SRL, Buenos Aires, Argentina), que é indicado para ser semelhante ao MTA. O pó também consiste em finas partículas hidrofílicas que formam um gel coloidal, na presença de umidade, solidificando e tomando presa em uma hora. Os principais componentes são silicato tricálcico, óxido tricálcico, aluminato tricálcico e outros óxidos (3). No entanto, segundo o fabricante, ele foi adicionado carbonato de cálcio para reduzir o Ph após

a presa 12,5 para 10,0 visando limitar a necrose da superfície, mas permitindo a ação da fosfatase alcalina.

Há alguns modelos experimentais utilizados para avaliar a biocompatibilidade dos materiais endodônticos, tais como cultura de células (12), que tem a vantagem de ser relativamente barato e rápido (13) e pode ser determinada com a realidade e reprodutibilidade (14). No entanto, não há estudos na literatura avaliando a viabilidade celular e produção de citocinas induzida pelo CPM<sup>®</sup>. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar os efeitos do CPM<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup> na viabilidade celular em fibroblastos e para avaliar os efeitos desses materiais sobre a liberação de IL-6 e IL-1 $\beta$ .



*Proposição*



*Proposição*

## 2.2 Proposição

Avaliar a citotoxicidade e a produção de citocinas (IL-1 $\beta$  e IL-6) por fibroblastos de camundongos estimulados pelos cimentos CPM<sup>®</sup> e Ângelus MTA<sup>®</sup>.





# *Material e Método*

*Material e Método*





## 2.3 Material e Método

### 2.3.1 Cultura de Células

Fibroblastos de camundongos (L929) foram cultivados em meio Dubelccos Modified Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), estreptomicina, (50 mg / ml) e 1% de antibiótico/ coquetel antimicótico (300U/ml, 300mg/ml estreptomicina, 5mg/ml anfotericina 100 g / ml) sob condições padrão de cultivo celular (37°C, 100% de umidade, 95% de ar e 5% CO<sub>2</sub>).

### 2.3.2 Material de Teste

Os materiais utilizados neste estudo foram a CPM (Cimento de Portland Modificado - Egeo SRL, Buenos Aires, Argentina) e Ângelus MTA (Ângelus, Londrina, Brasil). Os materiais testados foram preparados de acordo com as recomendações do fabricante.

### 2.3.3 Ensaio de Citotoxicidade

Fibroblastos (L929) foram semeados nas placas de 24 poços (3x10<sup>4</sup> células/ml / por poço). As células foram incubadas por 24 horas em uma atmosfera de ar umidificado de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 ° C. Os materiais de teste foram colocados em tubos de polietileno (Bard, CR; Bard LTDA Irlanda, Galway, Irlanda), com 1,1 mm de



diâmetro interno e 10-mm de comprimento e inseridos na cultura de fibroblastos. Seis poços foram utilizados para cada material, e um tubo vazio foi utilizado como controle. A exposição de culturas de células foi realizada por meio de exposição após 24 horas. Células viáveis foram coradas com corante formazan (3 - [4,5-dimetiltiazol-2-yl] -2,5-difenil brometo tetrazolium) (MTT) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO). MTT foi dissolvido em tampão de fosfato salina a 5 mg / mL e filtrado, a fim de esterilizar e remover uma pequena quantidade de resíduo insolúvel. Após o tempo indicado, a solução de MTT (20 ml por meio de 180 ml) foi adicionada a todos os poços de um ensaio, e as placas foram incubadas a 37 ° C por 4 horas. O meio foi então removido por inversão da placa e do despejo de 200 ml de álcool isopropílico, que foi adicionado aos poços e misturado durante 30 minutos para dissolver os cristais azul-escuros. A solução de azul foi transferida para uma placa de 96 poços e a absorbância foi lida no espectrofotômetro através da utilização de um teste de comprimento de onda de 570 nm (15).

### 2.3.4 Ensaio de Citocinas

Para o ensaio de citocinas, os materiais testados foram inseridos nos poços de 24 placas de fundo chato (Corning) e condensado até atingirem aproximadamente 1 mm de espessura e com o mesmo diâmetro dos poços. O material foi deixado tomar presa por 2 semanas em meio de cultura de células a 37 ° C. O meio era trocada diariamente durante este período.

Fibroblastos L929 foram semeados nos poços ( $10^6$  células ml / por poço) contendo os materiais ao fundo. As placas foram incubadas por 24 horas. Após a incubação, os meios de cultura foram coletados e analisados para IL-1 $\beta$  e IL-6 por



ELISA (R & D Systems, Inc, Minneapolis, Minn). Poços sem material, mas com culturas de células serviram como controle.

### **2.3.5 Análise Estatística**

Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância com correção de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).



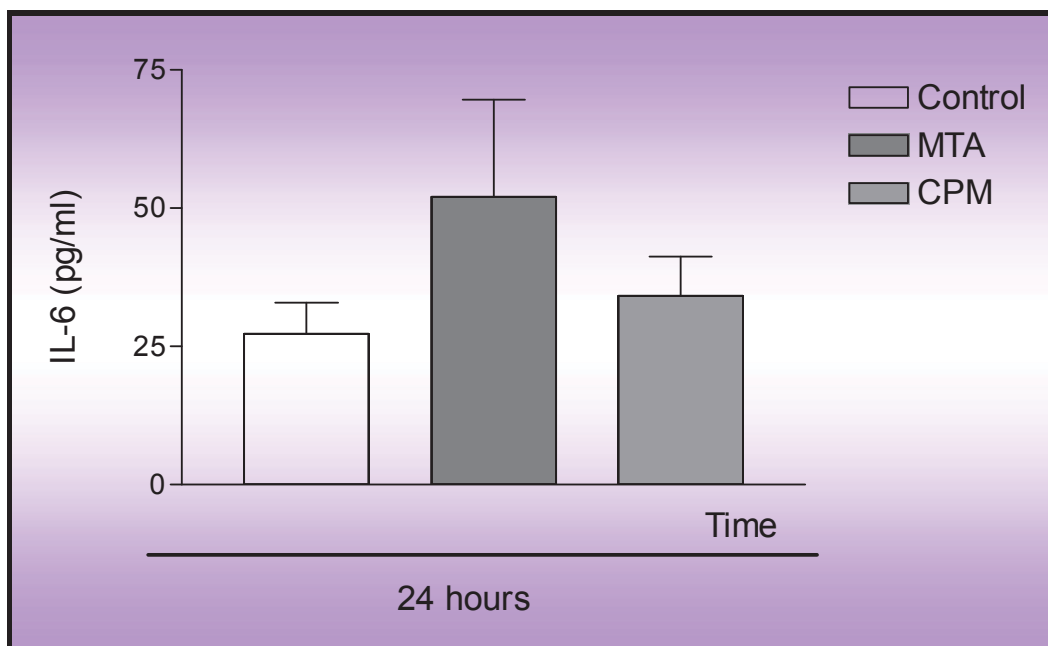
*Resultados*

*Resultados*



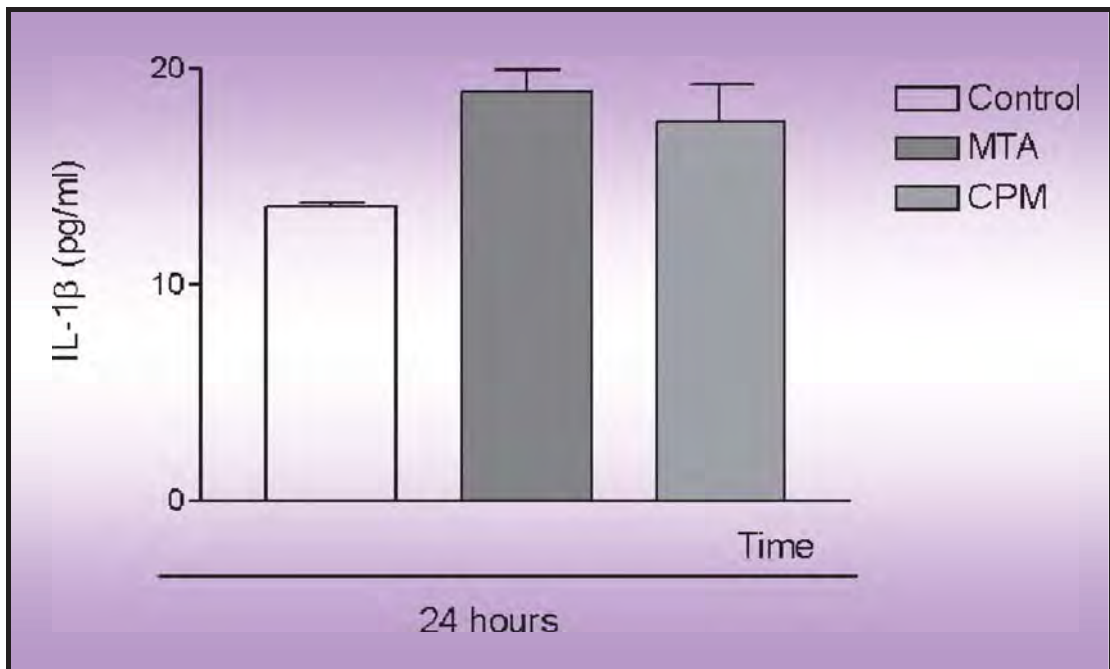
## 2.4 Resultados

O ensaio imunoenzimático (ELISA) revelou que a média dos níveis de IL-6 (pg/ml) foram mais elevados quando as células foram cultivadas na presença de CPM<sup>®</sup> e Ângelus<sup>®</sup> MTA do que no controle para 24 horas, mas sem diferença estatisticamente significativa (Fig. 1). A liberação de IL-1 $\beta$  foi maior do que o controle para o Ângelus<sup>®</sup> MTA e CPM<sup>®</sup>, mas com diferença estatisticamente significativa (Fig. 2). Após 24 horas, CPM<sup>®</sup> e Ângelus<sup>®</sup> MTA produziram um ligeiro efeito citotóxico, mas não inibiu a viabilidade das células (Fig. 3).

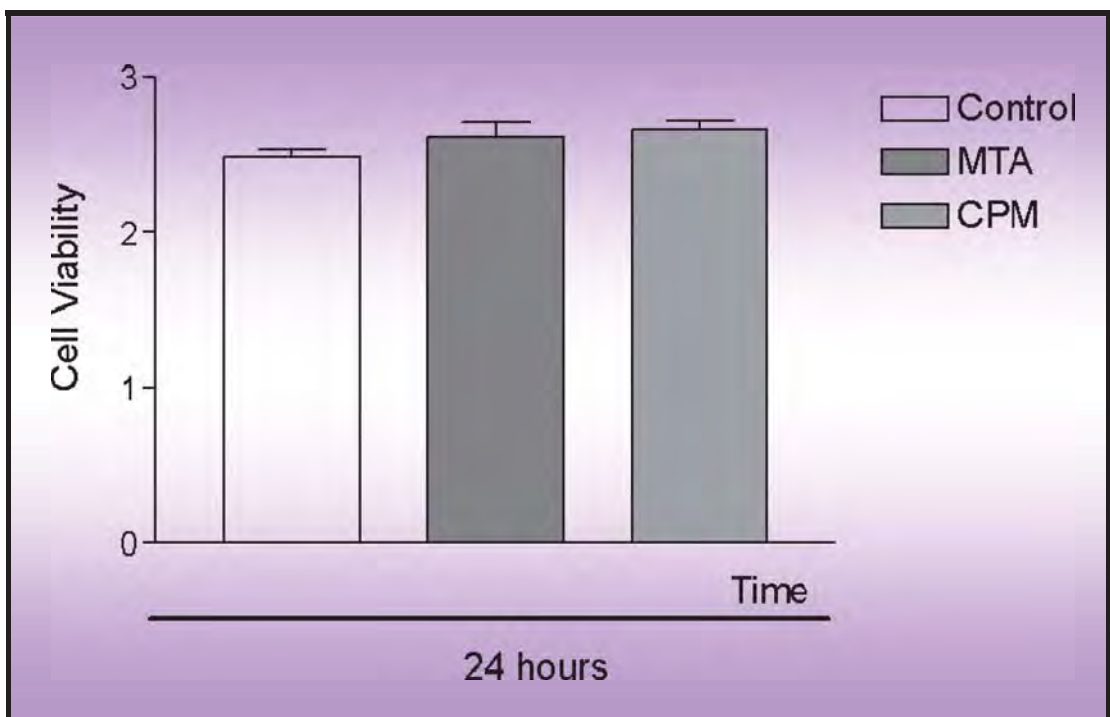


**Figura 1:** Os níveis médios de IL-6 foram levantados quando as células foram cultivadas na presença dos materiais. Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos experimentais e o grupo controle.





**Figura 2:** Houve comparação dos níveis de IL - 1 $\beta$  entre os grupos experimentais e o grupo controle. ( $P > 0,05$ ).



**Figura 3:** Viabilidade de fibroblastos não foi estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) entre os grupos experimentais e o grupo controle.



*Discussão*

*Discussão*



## 2.5 Discussão

Materiais endodônticos devem ser biocompatíveis e ter propriedades físico-químicas satisfatórias. Os efeitos tóxicos dos materiais utilizados para a terapia endodôntica são particularmente preocupantes, uma vez que pode causar degeneração do tecido periapical e atraso da cicatrização (16). Neste estudo, a viabilidade celular foi determinada pelo MTT com base na capacidade das enzimas desidrogenase mitocondrial em células vivas para converter os anéis de tetrazólium da solução de MTT formando cristais de formazan que possuem coloração violeta. As vantagens deste método são a simplicidade, rapidez e precisão. Além disso, ele não necessita de radioisótopos (15,17). As análises estatísticas dos dados do teste MTT não mostraram diferença significativa para o CPM em 24 horas. Os resultados do presente estudo concordam com os anteriores que mostraram que o MTA não foi citotóxico (18-21).

Características referentes ao CPM<sup>®</sup>, segundo o fabricante, este material tem similares ou melhores características físicas, químicas e biológicas em relação ao MTA, com as mesmas indicações clínicas (22). Neste estudo, a citotoxicidade do CPM<sup>®</sup> não foi estatisticamente diferente do MTA. O resultado pode ser explicado pela similaridade na composição do CPM<sup>®</sup> e do MTA à base de cimento de Portland e a redução do pH 12,5-10,0 não afetou a viabilidade celular.

A síntese de citocinas é complexa, e sua expressão e os efeitos são governados por vários fatores, incluindo outras células e mediadores químicos (23). Estudos anteriores mostraram que o MTA estimulou a produção de IL-1 $\beta$  por



osteoblastos (24-26). IL-1 $\beta$  é uma citocina que medeia a reabsorção óssea. É sintetizado por várias células e macrófagos perto da reabsorção óssea e os osteoclastos (27). Neste estudo, todos os materiais induziram a liberação de IL-1 $\beta$ , mas a quantidade não foi estatisticamente diferente do grupo controle. Por outro lado o IL-6 é uma citocina que medeia a lesão e infecção, e é secretado durante o processo de inflamatório, a fim de regulamentar os vários aspectos da resposta imune, a fase aguda da reação e os controle de infecção hematopoese (28). Animais depletados de IL-6 mostraram maiores lesões periapicais do que os camundongos normais (28). Segundo os resultados, todos os materiais induziram liberação de IL-6, mas a quantidade não foi estatisticamente diferente do grupo controle, que mostra que eles podem desempenhar um papel importante no controle da inflamação e promover o processo de cicatrização (5).



*Conclusão*

*Conclusão*



## 2.6 Conclusão

Foi possível concluir que o CPM<sup>®</sup> e Ângelus<sup>®</sup> MTA cinza não inibiram a viabilidade de fibroblastos L929. Todos os materiais induziram a liberação de IL-1 $\beta$  e IL-6, mas a quantidade não foi estatisticamente diferente do grupo controle.







# *Referências*

*Referências*





## 2.7 Referências

1. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993;19:541-4
2. Miranda RB, Fidel SR, Boller MAA. L929 cell response to root perforation repair cements: an in vitro cytotoxicity assay. *Braz Dent J* 2009;20:22-6.
3. Orosco FA, Bramante CM, Garcia RB, Bernardineli N, Moraes IG. Sealing ability of Gray MTA Angelus, CPM and MBPC used as apical plugs. *J Appl Oral Sci* 2008;16:50-4.
4. Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. *J Endod* 1993;19:591-5.
5. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Gomes AC, Faria MD, Lodi CS, Oliveira SHP. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *J Endod* 2009;35:1577-9.
6. Gomes-Filho JE, de Faria MD, Bernabé PF, et al. Mineral trioxide aggregate but not light-cure mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. *J Endod* 2008;34:62-5.
7. Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, et al. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995;79:756-63.
8. Holland R, Souza V, Nery MJ, et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tube filled with mineral trioxide aggregate, Portland cement or calcium hydroxide. *Braz Dent J* 2001;12:3-8.
9. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, et al. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 1995;21:349-53.
10. Chng HK, Islam I, Yap AU, et al. Properties of a new root-end filling material. *J Endod* 2005;31:665-8.
11. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabé PFE, Costa MTM. A Mineral Trioxide Aggregate sealer stimulated mineralization. *J Endod* 2009;35:256-60.
12. Schwarze T, Leyhausen G, Geurtsen W. Long-term cytocompatibility of various endodontic sealers using a new root canal model. *J Endod* 2002;28:749-53.



13. Vajrabhaya L, Sithisarn P. Multilayer and monolayer cell cultures in a cytotoxicity assay of root canal sealers. *Int Endod J* 1997;30:141–4.
14. Arenholt-Bindslev D, Hørsted-Bindslev P. A simple model for evaluating relative toxicity of root filling materials in cultures of human oral fibroblasts. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:219–26.
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
16. De Deus G, Ximenes R, Gurgel-Filho ED, et al. Cytotoxicity of MTA and Portland cement on human ECV 304 endothelial cells. *Int Endod J* 2005;38:604–9.
17. Huang FM, Tai KW, Chou MY, et al. Cytotoxicity of resin-, zinc oxide-eugenol-, and calcium hydroxide-based root canal sealers on human periodontal ligament cells and permanent V79 cells. *Int Endod J* 2002;35:153–8.
18. Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, et al. Cytotoxicity of endodontic materials. *J Endod* 1998;24:91–6.
19. Gorduysus M, Avcu N, Gorduysus O, et al. Cytotoxic effects of four different endodontic materials in human periodontal ligament fibroblasts. *J Endod* 2007;33:1450–4.
20. Vajrabhaya LO, Korsuwannawong S, Jantarat J, et al. Biocompatibility of furcal perforation repair material using cell culture technique: Ketac Molar versus ProRoot MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:48–50.
21. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, et al. Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod* 1995;21:489–92.
22. Bramante CM, Bramante AS, Moraes IG, Bernardineli N, Garcia RB. CPM es MTA: nuevos materiales de uso en endodoncia – experiências clinicas en el manejo de los materiales. *Rev Fac Odontol* 2006;17:7-10.
23. Stashenko P, Dewhirst FE, Rooney ML, et al. Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. *J Bone Miner Res* 1987;2:559–65.
24. Key JE, Rahemtulla FG, Eleazer PD. Cytotoxicity of a new root canal filling material on human gingival fibroblasts. *J Endod* 2006;32:756–8.



25. Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, et al. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 1997;37: 432–9.
26. Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, et al. Cellular response to mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1998;24:543–7.
27. Haglund R, He J, Jarvis J, et al. Effects of root-end filling materials on fibroblasts and macrophages in vitro. *Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;95: 739–45.
28. Huang GT-J, Do M, Wingard M, et al. Effect of interleukin-6 deficiency on the formation of periapical lesions after pulp exposure in mice. *Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:83–8.



*Americos*

*Americos*



# Anexo 1

## Comissão de ética

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
(CEEA)

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DA RESPOSTA TECIDUAL AOS CIMENTOS: CPM (Cimento Portland Modificado) e MTA Ângelus Cinza. ANÁLISE MICROSCÓPICA DE IMPLANTES REALIZADOS EM SUBCUTÂNEOS DE RATOS" sob responsabilidade do Prof. Dr. JOÃO EDUARDO GOMES FILHO e colaboração de MAX DOUGLAS FARIA e PEDRO FELÍCIO ESTRADA BERNABÉ, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 26 de outubro de 2007 de acordo com o protocolo no. 2007-002901.

Araçatuba, 31 de julho de 2008

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> CRISTINA ANTONIALI SILVA  
Presidente da CEEA - FOA/UNESP

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária  
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba - SP



## Anexo 2

### *Anestésicos para ratos*

Tabela de peso/dosagem utilizada pela disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP - em Experimentação de animais para conduta anestésica.

<b>Anestésicos</b>	<b>Peso</b>	<b>Dose normal</b>	<b>Dose maior</b>
Xilazina (Coopazine)	175g	0,06	0,08
Quetamina (Vetaset)	225g	0,14	0,16
Xilazina (Coopazine)	226g	0,08	0,1
Quetamina (Vetaset)	275g	0,18	0,2
Xilazina (Coopazine)	276g	0,09	0,11
Quetamina (Vetaset)	325g	0,21	0,23
Xilazina (Coopazine)	326g	0,11	0,13
Quetamina (Vetaset)	375g	0,24	0,26
Xilazina (Coopazine)	376g	0,12	0,14
Quetamina (Vetaset)	415g	0,28	0,30





# Anexo 3

## Procedimentos cirúrgicos



Figura 1: Tricotomia da região cirúrgica



Figura 2: Antissepsia

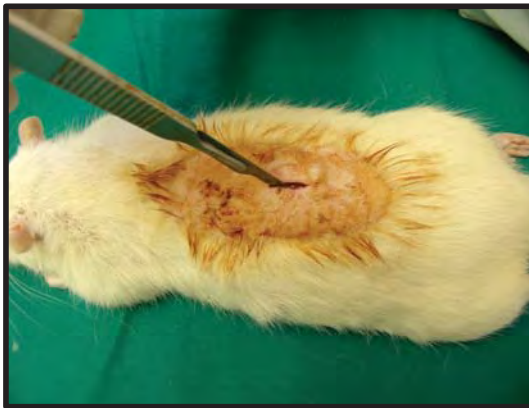


Figura 3: Incisão da área cirúrgica



Figura 4: Incisão da área cirúrgica

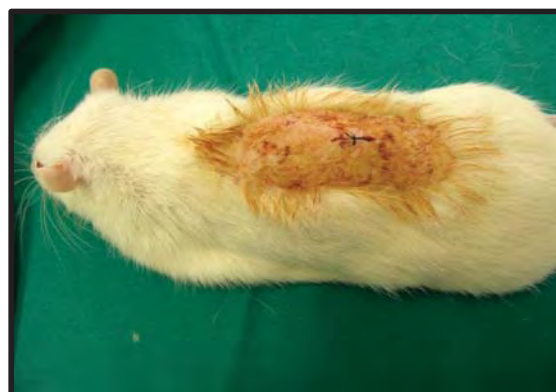


Figura 5: Sutura

## Anexo 4

### Referências-Introdução geral

1. Siqueira J.F. *et al* (2001). Ability of three root-end filling materials to prevent bacterial leakage. *Journal of Endodontics* **27**, 673–5.
2. Mangin C. *et al* (2003). The comparative sealing ability of hidroxyapatite cement, mineral trioxide aggregate and super ethoxybenzoic acid as root-end filling materials. *Journal of Endodontics* **29**, 261–4.
3. Martell B., Chandler N.P. (2002). Electrical and dye leakage comparison of three root-end restorative materials. *Quintessence International* **33**, 30–4.
4. Fogel H.M., Peikoff M.D. (2001) Microleakage of root-end filling materials. *Journal of Endodontics* **27**, 456–8.
5. Torabinejad M. *et al* (1995). Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *Journal of Endodontics* **21**, 349-3.
6. Economiades N. *et al* (2003). Short-term periradicular tissue response to mineral trioxide aggregate (MTA) as root-end filling material. *International Endodontic Journal* **36**, 44-8.
7. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **52**, 614 –21.
8. Gartner A.H., Dorn S.O. (1992). Advances in endodontic surgery. *Dental Clinics of North America* **36**, 357–79.
9. Lee S.J., Monsef M., Torabinejad M. (1993). Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *Journal of Endodontics* **11**, 541-4
10. Bernabé P.F.E. *et al* (2005). Comparative Study of MTA and Other Materials in Retrofilling of Pulpless Dogs Teeth. *Brazilian Dental Journal* **16**, 149-55.
11. Holland R. *et al* (2001a). Agregado de trióxido mineral y cemento portland em la obturación de conductos radiculares de perro. *Endodoncia* **19**, 275-80.



## Anexo 5

### Normas para publicação

Writing an effective article is a challenging assignment. The following guidelines are provided to assist authors in submitting manuscripts.

1. The *JOE* publishes original and review articles related to the scientific and applied aspects of endodontics. Moreover, the *JOE* has a diverse readership that includes full-time clinicians, full-time academicians, residents, students and scientists. Effective communication with this diverse readership requires careful attention to writing style.
2. **General Points on Composition** Authors are strongly encouraged to analyze their final draft with both software (e.g., spelling and grammar programs) and colleagues who have expertise in English grammar. References listed at the end of this section provide a more extensive review of rules of English grammar and guidelines for writing a scientific article. Always remember that clarity is the most important feature of scientific writing. Scientific articles must be clear and precise in their content and concise in their delivery since their purpose is to inform the reader. The Editor reserves the right to edit all manuscripts or to reject those manuscripts that lack clarity or precision, or have unacceptable grammar. The following list represents common errors in manuscripts submitted to the *JOE*:
  - a. The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs, sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section “c”, below), or sentences with little to no transition within a paragraph.
  - b. Keep to the point. The subject of the sentence should support the subject of the paragraph. For example, the introduction of authors’ names in a sentence changes the subject and lengthens the text. In a paragraph on sodium hypochlorite, the sentence, “In 1983, Langeland et al., reported that sodium hypochlorite acts as a lubricating factor during instrumentation and helps to flush debris from the root canals” can be edited to: “Sodium hypochlorite acts as a lubricant during instrumentation and as a vehicle for flushing the generated debris (Langeland et al., 1983)”. In this example, the paragraph’s subject is sodium hypochlorite and sentences should focus on this subject.
  - c. Sentences are stronger when written in the active voice, i.e., the subject performs the action. Passive sentences are identified by the use of passive verbs such as “was,” “were,” “could,” etc. For example: “Dexamethasone was found in this study to be a factor that was associated with reduced inflammation”, can be edited to: “Our results



demonstrated that dexamethasone reduced inflammation”. Sentences written in a direct and active voice are generally more powerful and shorter than sentences written in the passive voice.

d. Reduce verbiage. Short sentences are easier to understand. The inclusion of unnecessary words is often associated with the use of a passive voice, a lack of focus or run-on sentences. This is not to imply that all sentences need be short or even the same length. Indeed, variation in sentence structure and length often helps to maintain reader interest. However, make all words count. A more formal way of stating this point is that the use of subordinate clauses adds variety and information when constructing a paragraph.(This section was written deliberately with sentences of varying length to illustrate this point.)

e. Use parallel construction to express related ideas. For example, the sentence, “Formerly, Endodontics was taught by hand instrumentation, while now rotary instrumentation is the common method”, can be edited to “Formerly, Endodontics was taught using hand instrumentation; now it is commonly taught using rotary instrumentation”. The use of parallel construction in sentences simply means that similar ideas are expressed in similar ways, and this helps the reader recognize that the ideas are related.

f. Keep modifying phrases close to the word that they modify. This is a common problem in complex sentences that may confuse the reader. For example, the statement, “Accordingly, when conclusions are drawn from the results of this study, caution must be used”, can be edited to “Caution must be used when conclusions are drawn from the results of this study”.

g. To summarize these points, effective sentences are clear and precise, and often are short, simple and focused on one key point that supports the paragraph’s theme.

### **General Points on the Organization of Original Research Manuscripts**

a. **Title Page:** The title should describe the major conclusion of the paper. It should be as short as possible without loss of clarity. Remember that the title is your advertising billboard—it represents your major opportunity to solicit readers to spend the time to read your paper. It is best not to use abbreviations in the title since this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (e.g., use “sodium hypochlorite” rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at ([www.icmje.org](http://www.icmje.org))).

b. **Abstract:** The abstract should concisely describe the purpose of the study, the hypothesis, methods, major findings and conclusions. The abstract should describe the new contributions made by this study. The word limitations (150 words) and the wide distribution of the abstract (e.g., PubMed) make this section challenging to write clearly. This section often is written last by many authors since they can draw on the rest of the manuscript. Write the abstract in past tense since the study has been completed. Three to ten keywords should be listed below the abstract.



- c. **Introduction:** The introduction should briefly review the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address. The purpose of the study, the tested hypothesis and its scope should be described. Authors should realize that this section of the paper is their primary opportunity to establish communication with the diverse readership of the *JOE*. Readers who are not expert in the topic of the manuscript are likely to skip the paper if the introduction fails to provide sufficient detail. However, many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals.
- d. **Material and Methods:** The objective of the methods section is to permit other investigators to repeat your experiments. The three components to this section are the experimental design, the procedures employed, and the statistical tests used to analyze the results. The vast majority of manuscripts should cite prior studies using similar methods and succinctly describe the particular aspects used in the present study. The inclusion of a “methods figure” will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then the authors should carefully describe the method and include validation experiments. If the study utilized a commercial product, the manuscript should state that they either followed manufacturer’s protocol or specify any changes made to the protocol. Studies on humans should conform to the Helsinki Declaration of 1975 and state that the institutional IRB approved the protocol and that informed consent was obtained. Studies involving animals should state that the institutional animal care and use committee approved the protocol. The statistical analysis section should describe which tests were used to analyze which dependent measures; p-values should be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis, drop-outs from clinical trials, etc.
- e. **Results:** Only experimental results are appropriate in this section (i.e., neither methods nor conclusions should be in this section). Include only those data that are critical for the study. Do not include all available data without justification, any repetitive findings will be rejected from publication. All Figs./Charts/Tables should be described in their order of numbering with a brief description of the major findings.

**Figures:** There are two general types of figures. The first type of figure includes photographs, radiographs or micrographs. Include only essential figures, and even if essential, the use of composite figures containing several panels of photographs is encouraged. For example, most photo-, radio- or micrographs take up one column-width, or about 185 mm wide X 185 mm tall. If instead, you construct a two column-width figure (i.e., about 175 mm wide X 125 mm high when published in the *JOE*), you would be able to place about 12 panels of photomicrographs (or radiographs, etc.) as an array of four columns across and three rows down (with each panel about 40 X 40 mm). This will require some editing on your part given the small size of each panel, you will only be able to illustrate the most important feature of each photomicrograph. Remember that each panel must be clearly identified with a letter (e.g., “A”, “B”, etc.), in order for the reader to understand each individual panel. Several nice examples of composite figures are seen in recent articles by Chang, et al, (*JOE* 28:90, 2002), Hayashi, et al, (*JOE* 28:120, 2002) and by Davis, et al (*JOE* 28:464, 2002). At the





Editor’s discretion, color figures may be published at no cost to the authors. However, the Editor is limited by a yearly allowance and this offer does not include printing of reprints.

The second type of figure are graphs (i.e., line drawings) that plot a dependent measure (on the Y axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). Examples include a graph depicting pain scores over time, etc. Graphs should be used when the overall trend of the results are more important than the exact numerical values of the results. For example, a graph is a convenient way of reporting that an ibuprofen treated group reported less pain than a placebo group over the first 24 hours, but was the same as the placebo group for the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.

**Tables:** Tables are appropriate when it is critical to present exact numerical values. However, not all results need be placed in either a table or figure. For example, the following table may not necessary:

% NaOCl	N/Group	% Inhibition of Growth
0.001	5	0
0.003	5	0
0.01	5	0
0.03	5	0
0.1	5	100
0.3	5	100
1	5	100
3	5	100

Instead, the results could simply state that there was no inhibition of growth from 0.001-0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03-3% NaOCl (N=5/group). Similarly, if the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure. These and many other suggestions on figure and table construction are described in additional detail in Day (1998).

f. **Discussion:** The conclusion section should describe the major findings of the study. Both the strength and weaknesses of the observations should be discussed. What are the major conclusions of the study? How does the data support these conclusions? How do these findings compare to the published literature? What are the clinical implications? Although this last section might be tentative given the nature of a particular study, the authors should realize that even preliminary clinical implications might have value for the clinical readership. Ideally, a review of the potential clinical significance is the last section of the discussion.

g. **References:** The reference style follows Index Medicus and can be efficiently learned from reading past issues of the *JOE*. Citations are placed in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits in the number of references for review articles.





4. **Page Limitations for Manuscripts in the Category of Basic Science/Endodontic Techniques**

- a. **What is the limitation?** Original research reports in the category of basic science/endodontic techniques are limited to no more than 2,000 words (total for the abstract, introduction, methods, results and conclusions), and a total of three Figs./Charts/Tables. If a composite figure is used (as described above), then this will count as two of the three permitted Figs./Charts/Tables.
- b. **Does this apply to me?** Manuscripts submitted to the *JOE* can be broadly divided into several categories including review articles, clinical trials (e.g., prospective or retrospective studies on patients or patient records, or research on biopsies excluding the use of human teeth for technique studies), basic science/biology (animal or culture studies on biological research related to endodontics, or relevant pathology or physiology), and basic science/techniques (e.g., stress/strain/compression/strength/failure/composition studies on endodontic instruments or materials). Manuscripts submitted in this last category are the only category subject to these limitations. If you are not sure whether your manuscript falls within this category please contact the Editor by e-mail at [jendodontics@uthscsa.edu](mailto:jendodontics@uthscsa.edu).
- c. **Why page limitations?** Most surveyed stakeholders of the *JOE* desire timely publication of submitted manuscripts and an extension of papers to include review articles and other features. To accomplish these goals, we must reduce the average length of manuscripts since increasing the *JOE*'s number of published pages is prohibitively expensive. Although a difficult decision, restricting this one category of manuscripts accomplishes nearly all of these goals since ~40-50% of published papers are in this category.
- d. **How do I make my manuscript fit these limitations?** Adhering to the general writing methods described in these guidelines (and in the resources listed below) will help to reduce the size of the manuscript. Authors are encouraged to focus on only the essential aspects of the study and to avoid inclusion of extraneous text and figures. The Editor will reject manuscripts that exceed these limitations.

2. **Available Resources:**

Strunk W, White EB. The Elements of Style. Allyn & Bacon, 4th ed, 2000, ISBN 020530902X

- a. Day R.. How to Write and Publish a Scientific Paper. Oryx Press, 5th ed. 1998. ISBN 1-57356-164-9
- b. Woods G. English Grammar for Dummies. Hungry Minds:NY, 2001 (an entertaining review of grammar)
- c. Alley M. The Craft of Scientific Writing. Springer, 3rd edition 1996 SBN 0-387-94766-3.

Alley M. The Craft of Editing. Springer, 2000 SBN 0-387-98964-1.

